



KITIININ JA SEN HAJOAMISTUOTTEIDEN HYÖDYNTÄMINEN KASVINVILJELYSSÄ

Joni Kosamo
Pro gradu -tutkielma
Kemian tutkinto-ohjelma
Oulun yliopisto
2021

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	4
2 KITIININ KEMIALLINEN RAKENNE, OMINAISUUDET JA LÄHTEET	6
2.1 Kitiinin kemiallinen rakenne	6
2.2 Kitiinin biosynteesi.....	7
2.3 Kitiinin hajoamistuotteet luonnossa	10
2.3.1 Kitiinin hajoaminen ja deasetyloituminen	10
2.3.2 Hajoamistuote kitosaani	11
2.3.3 Hajoamistuote kito-oligosakkaridi	12
2.4 Hyönteisten ja merieläinten kitiinin fysiologia	12
2.4.1 Hyönteisten frassi.....	13
2.4.2 Merieläinten kitiinirakenne	13
3 KITIININ JA SEN HAJOAMISTUOTTEIDEN ANALYTIikka.....	16
3.1 Kitiinin puhdistaminen	16
3.2 Kitiinin deasetylointi kitosaaniksi	19
3.3 Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden analyttiset menetelmät	19
3.3.1 Kitiinin ja kitosaanin deasetylaatioasteen määrittäminen infrapunaspektroskopialla ja titrauksella.....	21
3.3.2 Röntgenpohjaiset analyysimenetelmät kitiinin polymorfisen muodon ja kiderakenteen osalta.....	22
3.3.3 Termogravimetrinen analyysi polymorfisen muodon ja puhtauden määrittämisessä.....	24
3.3.4 Alkuaineanalyysi kitiinin ja kitosaanin deasetylaatioasteen määrittämisessä ..	25
3.3.5 Molekyyli­massan määrittäminen viskosimetrillä ja geelipermeaatiokromatografialla	26
3.3.6 Kitiinin pinnan morfologian määrittäminen pyyhkäisyelektronimikroskopialla ja muilla mikroskooppisilla menetelmillä	28
3.3.7 dGlcN:n määrittäminen kromatografisilla ja elektroforeettisilla menetelmillä.....	29
3.3.8 Kitiinin ja kitosaanin NMR-spektroskopia	30
3.3.9 dGlcN:n määrittäminen kitinaasitestillä	31
4 KASVIEN FYSIOLOGIA JA PUOLUSTUSMEKANISMIT	32
4.1 Kasvien fysiologia	32
4.2 Kasvien puolustusmekanismi	32

4.3 Kitinaasit patogeenien aiheuttaman stressin yhteydessä	36
4.4 Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden vaikutus viljelykasveihin	38
4.4.1 Kitosaanin antimikrobinen aktiivisuus ja vaikutus virustauteihin	40
4.4.2 Kitosaanin vaikutukset geenien ilmentymiseen	40
5 KITIININ JA SEN HAJOAMISTUOTTEIDEN HYÖDYNTÄMINEN	
LANNOITTEENA	42
5.1 Kitinolyyttinen reitti	44
5.2 Kitosaani biolannoitteena	46
5.3 Kitosaanipäällysteen käyttö lannoitteessa	49
5.4 Hyönteisten frassin lannoituspotentiaali.....	52
6 YHTEENVETO	54
7 KIRJALLISUUSVIITTEET.....	57

1 JOHDANTO

Kitiini on selluloosan jälkeen yleisin luonnossa esiintyvistä polysakkarideista. Kitiiniä esiintyy luonnossa niveljalkaisten eliöiden, esimerkiksi äyriäisten ja hyönteisten tukirangassa, sekä sienten, levien ja hiivojen soluseinämissä. Viime vuosikymmeninä lisääntynyt kitiinikemian tuntemus ja kitiinipitoisten jättemateriaalien lisääntynyt saatavuus elintarviketeollisuudesta, eli merieläinten lisäksi myös hyönteisten frassi, ovat johtaneet kitiinipitoisten tuotteiden testaamiseen ja kehittämiseen monenlaisiin sovelluksiin maatalousalalla. Kasvien puolustusmekanismien tunteminen ja kitiinin ja sen hajoamistuotteiden toiminnan ymmärtäminen auttavat maataloussektorin tutkijoita kehittämään tuotteita ja innovaatioita suomalaisiin olosuhteisiin.

Kitiini ja kitosaani on karakterisoitava soveltuvuuden arvioimiseksi haluttuihin sovelluksiin. Kitiinin ja kitosaanin ominaisuuksien, kuten deasetylaatioasteen, molekyylipainon, viskositeetin, morfologian ja liukoisuuden, arvioimiseksi voidaan käyttää useita menetelmiä. Deasetylaation käsittelyolosuhteet voivat vaikuttaa kitosaanin molekyylipainoon ja siten sen fysikaaliskemiallisiin ominaisuuksiin ja bioaktiivisuuteen.

Suomessa on kiinnostuttu hyönteistuotannossa syntyvän frassin eli hyönteisten rakenteiden ja lannan hyödyntämisestä potentiaalisena aktivoijana kasvien puolustusmekanismeille. Kitiinipohjaiset käsittelyt lisäävät ja vahvistavat kasvien kasvua, ravinto-ominaisuuksia ja vastustuskykyä taudinaiheuttajia vastaan, jolloin frassin käyttö voisi vähentää esimerkiksi pestisidien käyttöä. Suorien vaikutusten lisäksi kitiini aiheuttaa kasvien kasvuun vaikuttavien hyödyllisten mikrobien kasvua ja aktiivisuutta.

Maatalouden ympäristövaikutusten minimoimiseksi on tärkeää vähentää lannoitteiden ja torjunta-aineiden käyttöä. Lannoitteiden ravintoaineita menetetään runsaasti muuhun kuin kasvien käyttöön. Kitosaania on käytetty epäorgaanisten lannoitteiden vapautumisen torjunnassa, jotta saadaan rajoitettua liiallisen lannoituksen haitallisia vaikutuksia. Kitosaanipäällysteen käyttö lannoitteissa parantaa kasvilannoitteiden oton tehokkuutta ja vähentää tuotantokustannuksia. Kitosaanibiolannoite ja kitosaanilla päällystetty lannoite laukaisevat kasvien kasvua enemmän kuin synteettiset lannoitteet. Lisäksi kitosaani ja sen johdannaiset toimivat muun muassa sienien ja sukkulamatojen estäjinä häiritsemättä maaperän hyödyllisiä mikrobeja.

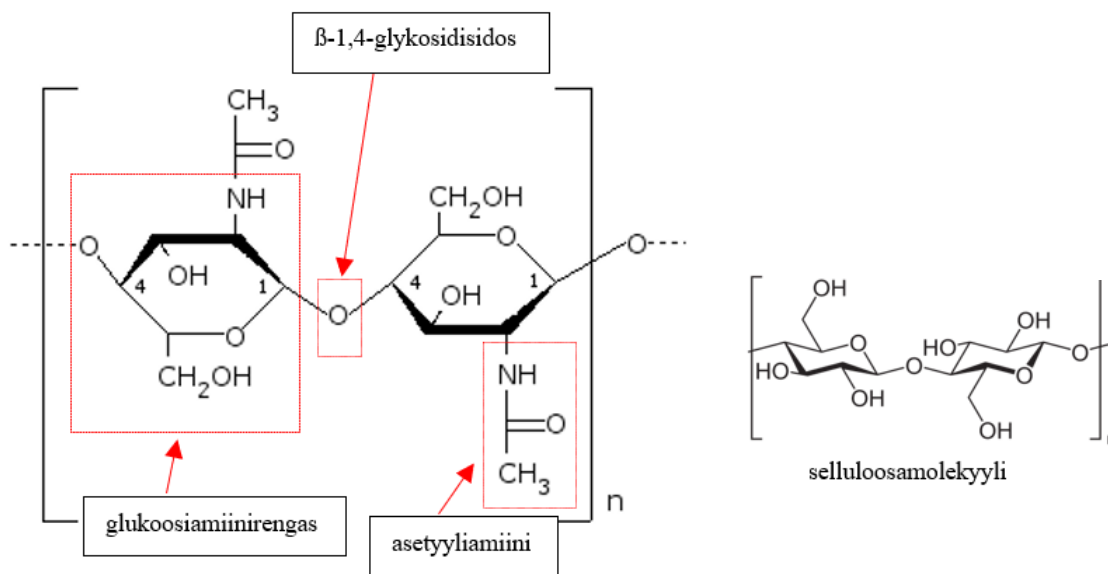
Hitaasti vapautuvissa lannoitteissa ravinnepitoisuudet vapautuvat vähitellen ja samaan aikaan kun kasvi tarvitsee ravinteita. Nämä lannoitteet voidaan valmistaa päällystämällä perinteisten lannoitteiden rakeet erilaisilla materiaaleilla, jotka vähentävät niiden liukenemisnopeutta. Kitosaani on lupaava päällystemateriaali. Hitaasti vapautuvien lannoitteiden ja superabsorboivien polymeerien optimoitu yhdistelmä parantaa kasvien ravintoa, lieventää vesiliukoisten lannoitteiden ympäristövaikutuksia, vähentää veden haihtumista ja alentaa kastelutiheyttä.

Tässä työssä perehdyttiin kitiinin ja sen hajoamistuotteiden analytiikkaan, kasvien puolustusmekanismeihin ja lannoitepotentiaaliin. Työssä tarkasteltiin hyönteisten frassin hyödyntämistä kasvinviljelyssä.

2 KITIININ KEMIALLINEN RAKENNE, OMINAISUUDET JA LÄHTEET

2.1 Kitiinin kemiallinen rakenne

Kitiini on selluloosan jälkeen yleisin luonnossa esiintyvistä polysakkarideista. Kitiiniä esiintyy luonnossa niveljalkaisten eliöiden (muun muassa hämähäkkieläimet, äyriäiset, hyönteiset ja tuhatjalkaiset) tukirangassa sekä sienten, levien ja hiivojen soluseinämissä. Selluloosaan nähden kitiinillä on lähes samankaltainen kemiallinen rakenne (kuva 1), minkä vuoksi niillä on samankaltaisia tehtäviä, toimien monissa organismeissa usein rakennetta tukevinä yhdisteinä. Kitiinin molekyylipaino voi olla jopa 106 kilodaltonia (kDa). Kitiini on kemiallisesti luokiteltuna lineaaristen N-asetyyylglukosamiiniyksiköiden eli N-asetyyli-2-amino-2-deoksi-D-glukoosi yksiköiden (GlcNAc) muodostama polysakkaridi, joka voi muodostaa pitkiä ketjuja.^{1,2}

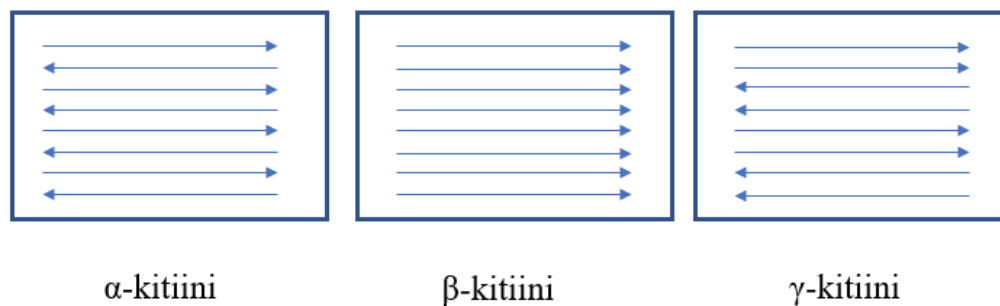


Kuva 1. Kitiinin ja selluloosan kemiallinen rakenne. Muokattu lähteistä.^{1,2}

Kitiini on jäykkä ja haaroittumaton vahva yhdiste β-(1→4) sidoksista johtuen. Rakenteessa on paljon hydroksyyliiryhmiä, sekä asetyyliamiiniryhmiä. Asetyyliamiiniryhmien avulla kitiini voi muodostaa vetysidoksia itsensä ja muiden aineiden

kanssa. Tämä ominaisuus tekee kitiinistä kuitumaisen kiteisen aggregaatin. Kiteisyys vaikuttaa kitiinin tyyppisten rakenteiden lujuuteen. Kitiini ei liukene tavallisiin liuottimiin, esimerkiksi veteen, neutraalissa pH:ssa. Kitiini liukenee emäksiseen väkevään eli noin 50 % natriumhydroksidiliukseen.^{3,4}

Kitiiniä esiintyy luonnossa kolmessa eri polymorfisessa muodossa: α -, β - ja γ -muodossa (kuva 2). Jokaisella muodolla on omanlaisensa polymeeriketjun järjestys. α -kitiinin ketjut ovat järjestäytyneet vastakkain. Ne sisältävät paljon sisäisiä vetysidoksia (H-sidoksia). Näin ollen α -kitiini ei kykene turpoamaan vedessä ja on jäykin kitiinimuoto. β -kitiinissä ketjut ovat järjestäytyneet rinnakkain, ja siinä on vähemmän sisäisiä H-sidoksia kuin α -kitiinillä. β -kitiini turpoaa siten vedessä helpommin ja on joustavampi ja pehmeämpi rakenteeltaan. γ -kitiinille tunnusomaista on kahden rinnakkaisen ketjun ja kahden vastakkaisen ketjun joukot. γ -kitiini on α -kitiinin variantti. Tärkeimmät α -, β - ja γ -kitiinin lähteet ovat ravut, katkaravut, mustekalat ja loligot.⁵⁻⁷



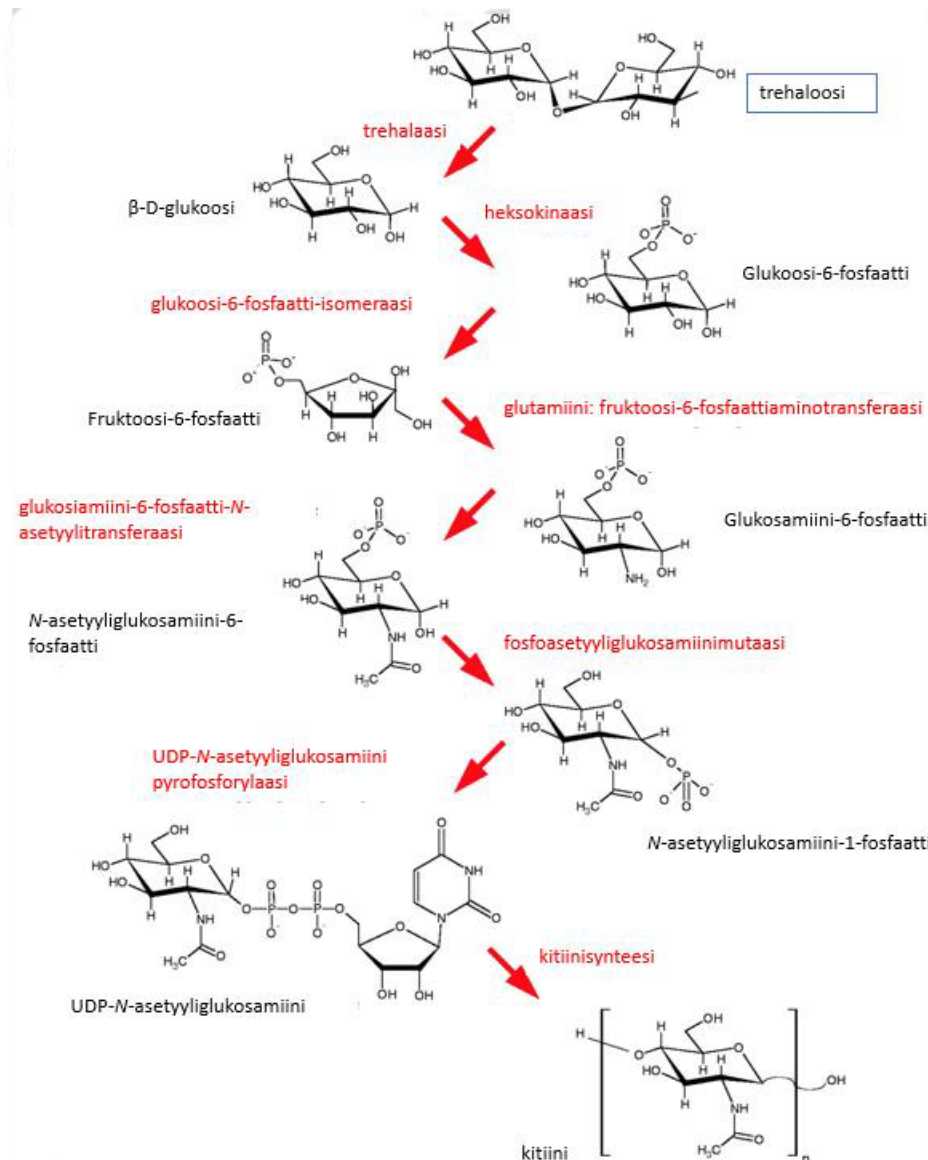
Kuva 2. Kitiinin luonnossa esiintyvät eri polymorfiset muodot (α , β ja γ). Muokattu lähteestä.⁷

2.2 Kitiinin biosynteesi

Kitiinin solun biosynteesi tapahtuu luonnossa kolmessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa roolissa on entsyymikatalyyysi, jonka kautta sytoplasminen kitiinipolymeerin muodostuminen tapahtuu. Toisessa vaiheessa rakentuu membraanin kitiinipolymeerirakenne, jonka jälkeen se vapautuu solun ulkoiseen eli ekstrasellulaariseen tilaan. Kolmannessa eli päättyvässä vaiheessa yksittäiset kitiinipolymeerit kokoontuvat spontaanisti muodostaen kiteiset mikrofibrillit. Mikrofibrillit sekoittuvat sokereiden,

proteiinien, glykoproteiinien ja proteoglykaanien kanssa muodostamalla sienten tai niveljalkaisten soluseinämää.⁸

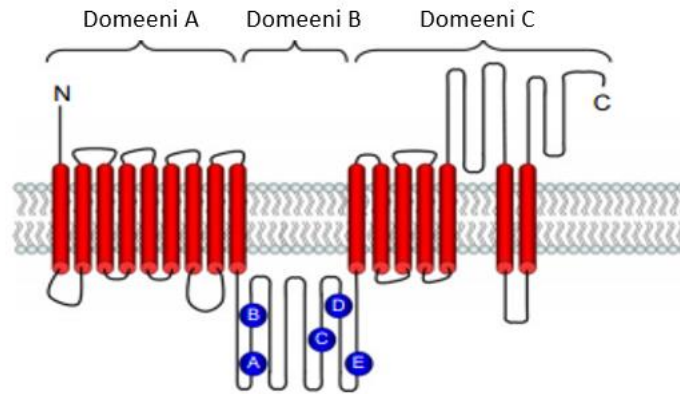
Kitiinin erilaisten polymorfien muodostuminen molekyylitasolla tapahtuu kitiinisynteesin katalyysireaktiolla (kuva 3). Kitiinin synteesi alkaa trehaloosin hydrolyysillä α - ja β -D-glukoosiksi. Glukoosi etenee glukolyyttisen reaktioreitin peräkkäisten reaktioiden kautta heksokinaasin ja glukoosi-6-fosfaatti-isomeraasin avulla fruktoosi-6-fosfaatiksi. Fruktoosi-6-fosfaattiin liittyy fruktoosi-6-fosfaattiaminotransferaasin avulla glutamiini, jolloin muodostuu glukosamiini-6-fosfaatti. Glukosamiini-6-fosfaatti asetyloidaan glukosamiini-6-fosfaattiasetyylitransferaasilla ja isomerisoidaan N-asetyyliglukosamiinifosfaattimutaasilla ja lopuksi aktivoidaan UDP-N-asetyyli-D-glukosamiini pyrofosforylaasilla. UDP-N-asetyyli-D-glukosamiini muutetaan lopussa kitiinisynteesissä kitiiniksi.⁹



Kuva 3. Kitiiniin biosynteesi hyönteisissä. Biosynteesi alkaa trehaloosista. Muokattu lähteestä.¹⁰

Kitiinisynteesissä kitiinirakenteeseen liittyy esimerkiksi proteiineja. Kuvassa 4 on esitetty proteiinin liittyminen kitiiniin, josta muodostu membraanirakenne. Transmembraaniproteiini, joka liittyy kuvassa 4 kitiinipolymeerirakenteeseen, jakautuu kolmeen rakenteelliseen domeeniin, A, B ja C. Proteiini koostuu polypeptidiketjusta, jossa on N- ja C- terminaalinen pää. Pääet laskostuvat polypeptidiketjun vasemmalle ja oikealle puolelle. Transmembraanin heliksit on merkitty punaisilla sylintereillä. Domeeni A sisältää yhdeksän transmembraaniheliksiä. Domeeni B on täysin sytoplasmisen ja domeeni C sisältää kaksi klusteria transmembraaniheliksiä, joista ensimmäiset klusterit (5 heliksiä) ovat

osallisena kitiinin ekstruusioon eli työntymiseen. Kaksi muuta heliksiä ovat lähempänä proteiinin C-terminaalipäätä.¹¹



Kuva 4. Kitiinisynteesissä proteiinin liittyminen kitiinin polymeerirakenteeseen.

Muokattu lähteestä.¹¹

2.3 Kitiinin hajoamistuotteet luonnossa

Kitiinin hajoaminen eli katabolia on tärkeä kahdessa peruskontekstissa. Ensinnäkin kitiini voi olla merkittävä este tai energialähde suurelle joukolle mikro-organismeja, loisia ja saalistajia, jotka hajottavat niveljalkaisia. Lähes kaikki edellä mainitut organismit ovat riippuvaisia erittäin tehokkaista kitiinin hajoamisentsyymeistä, jotka hajottavat kitiinin ja vapauttavat energiaa. Toiseksi kitiinin tarjoama rakenteellinen etu jäykän eksoskeletonin eli ulkoisen tukirangan muodossa on ristiriidassa kehon koon lineaarisen ja asteittaisen kasvun kanssa. Niveljalkaiset ovat ratkaisseet tämän ongelman tuhoamalla ja rakentamalla kitiiniä erityisen prosessin kautta. Myös tässä yhteydessä tarvitaan useita entsyymaattisia järjestelmiä pintarakenteiden ja suolistoa ympäröivän kitiiniarkkitehtuurin huolelliseen purkamiseen.¹¹

2.3.1 Kitiinin hajoaminen ja deasetyloituminen

Kitiini hajoaa luonnossa eli se on biohajoavaa. Käsite biohajoavuus viittaa entsyymien tai muiden biopohjaisten reaktioiden kautta tapahtuvaan biomateriaalien hajoamiseen. Kitiini

hajoaa kitinaasin vaikutuksesta ensin oligosakkaridiksi ja lopulta N-asetyyli-glukosamiiniksi tai N-glukosamiiniksi.¹²

Kitiiniä voidaan hajottaa pilkkomalla kitiinin pitkiä polysakkaridiketjuja glykosididosten kohdalta, jolloin muodostuu eripituisia kito-oligosakkarideja ja GlcNAc-yksiköitä. Sitä voidaan hajottaa myös deasetyloimalla entsymaattisesti kitiinin asetyyliamiiniryhmiä. Deasetylaation tuloksena voi syntyä kitosaania. Mitään tarkkaa rajaa kitiinin ja sen hajoamistuotteiden erottamiseksi ei ole määritetty. Kitiini on luonnostaankin osittain deasetyloitunut. Hajoamistuotteet ovat hyvin samakaltaisia yhdisteitä, eroten vain reaktiivisten sivuketjujen määrissä ja polysakkaridiketjujen pituudessa. Esimerkiksi yhdiste määritellään kitosaaniksi, jos se koostuu pääosin deasetyloituneista GlcNAc-yksiköistä. Kitiinin hajoamistuotteet voidaan luokitella kito-oligosakkarideiksi, jos niiden depolymerisaatioaste on suuri ja molekyyli-paino pieni.^{13,14}

Tärkeimmät parametrit kitiinien ja kitosaanien kemiallisten ja fysikaalisten ominaisuuksien määrittämisessä ovat asetylaatio- tai deasetylaatioaste, sekä molekyyli-massa ja sen jakautuminen. Molempiin parametreihin vaikuttavat lähtöaineen valmistusmenetelmä ja biologinen lähde. Nämä määräävät molempien polysakkaridien toiminallisia, fysikaaliskemiallisia ja biologisia ominaisuuksia, jotka ovat olennaisia halutun sovellutuksen tai lopputuotteen valinnassa. Esimerkiksi hydrofiilisyys, liukoisuus, kiteisyys, geeliytymiskapasiteetti ja biologinen hajoaminen riippuvat asetylaatio/deasetylaatioasteesta ja molekyyli-massasta. Deasetyloinnin aste määritellään glukosamiinimonomeerijäämien osuutena kitosaaniketjussa ja se voi vaikuttaa edellä mainittujen ominaisuuksien lisäksi kitosaanin suorituskykyyn monissa sovelluksissa. Deasetylaatio voidaan optimoida ja säätää tarpeen mukaan muuttamalla erilaisia tekijöitä, kuten lämpötilaa, aikaa, alkalipitoisuutta, kiinteiden aineiden ja liuottimien suhdetta ja hiukkaskokoa.¹⁵⁻¹⁷

2.3.2 Hajoamistuote kitosaani

Kitosaani on lineaarinen polysakkaridi, joka koostuu kahdenlaisista monomeeriyksiköistä: N-asetyyli-2-amino-2-deoksi-D-glukoosiyksiköistä ja 2-amino-2-deoksi-D-glukoosiyksiköistä, kuten kitiinikin. Kitosaani on kitiinin hajoamistuote. Sillä on jäykkä ja haaroittumaton rakenne β -(1 \rightarrow 4) sidoksista johtuen. Kitosaani sisältää pienemmän määrän N-asetyyli-2-amino-2-deoksi-D-glukoosiyksiköitä kuin kitiini ja liukenee siten happamiin liuottimiin. Amino- ja asetyyliryhmät muodostavat molekyylin sisäisiä tai molekyylien

välisiä vetysidoksia. Nämä johtavat lineaaristen ja hyvin kiteisten aggregaattien muodostumiseen.¹⁸

Kitosaanilla on mielenkiintoisia biologisia ominaisuuksia. Kitosaani ehkäisee muun muassa joidenkin gram-positiivisten ja gram-negatiivisten bakteerien ja esimerkiksi keuhkosityöpäkasvainten kasvua ja toimii elimistön immuunipuolustuksen aktivoijana. Tämän vuoksi kitosaania käytetäänkin paljon muun muassa lääketieteessä, elintarvike- ja kemianteollisuudessa sekä maataloudessa.¹⁹

2.3.3 Hajoamistuote kito-oligosakkaridi

Kito-oligosakkaridi (COS) on kitiinin ja kitosaanin pääasiallinen hajoamistuote. Kito-oligosakkaridilla on merkittävä rooli muun muassa biolääketieteen ja maatalouden alueilla. COS:lla on korkeampi deasetylaatio- ja depolymerisaatioaste kuin kitosaanilla. COS:n polymeerisaatioaste on ≤ 20 ja keskimääräinen molekyylipaino on alhainen eli alle 3,9 kDa. Se on herkästi hapettava aine ja se säilyykin parhaiten C-vitamiinin ja natriumkloridin läsnäollessa. C-vitamiinilla on kyky luovuttaa elektroneja, jolloin elektroneja vastaanottava molekyyli, kuten COS, ei pääse hapettumaan. COS:lla on hyvä liukoisuus veteen, alhainen molekyylipaino ja kosteudensitomiskyky. Lisäksi sillä on voimakas absorptio-ominaisuus erilaisille aineille ja hyvä biologinen yhteensopivuus esimerkiksi ihmisen kannalta. Se soveltuu hyvin esimerkiksi parantamaan ruuan laatua, ihmisten terveyttä ja estämään bakteerien ja sienten kasvua.²⁰⁻³²

2.4 Hyönteisten ja merieläinten kitiinin fysiologia

Hyönteiset voivat syntetisoida kitiiniä glukoosista, glukosamiinista, tai GlcNAc:sta. Kaikkia kolmea α -, β - ja γ -muotoa löytyy hyönteisistä. Hyönteiset ovat selkärangattomia eläimiä, joilla on kitiinistä koostuva ulkoinen tukiranka, kutikula. Kutikulan tärkein tehtävä on toimia eliön rakenteena, johon lihakset ja sisäelimet kiinnittyvät. Lisäksi kitiiniä on myös sisäisissä rakenteissa kuten ruuansulatuskanavan seinämien kudoksissa. Se suojaa seinämiä kulumiselta ja haitallisilta mikrobeilta.^{3,33}

Kutikula koostuu pääosin kitiinin muodostamista ketjuista (20 - 50 %), ja kitiiniverkoston sekä typen ja proteiinien alustasta. Kutikulan kitiini on osittain deasetyloitunutta joten se sisältää myös kitiininhajoamistuotteita kitosaania ja kito-oligosakkarideja. Kitiinikuoressa

on myös vettä, lipidejä ja mineraaleja. Mineraalipitoisuudet kutikulassa ovat kuitenkin yleisesti hyvin vähäisiä.^{3,34,35}

Kutikulassa on useita proteiineja, joista noin puolet voivat olla kitiiniin sitoutuneina. Kitiiniin kovalenttisilla sidoksilla kiinnittyneet proteiinit muodostavat kitiinin kanssa glykoproteiini-komplekseja. Kutikulassa proteiineja voi olla myös kiinnittyneenä sekä vetysidoksin että muiden sidosten ja vuorovaikutusten avulla. Hyönteiset sisältävät kitiiniä 2,7 - 49,8 mg/kg tuorepainosta mitattuna ja kuivapainosta mitattuna 11,6 - 137,2 mg/kg. Kutikulan rakenne on lajikohtainen ja esimerkiksi proteiinien ja kitiinin suhde vaikuttaa kovuuteen ja paksuuteen. Kitiinisynteesi, kutikulaaristen proteiinien synteesi, suoliston muodostuminen ja pigmentaatio ovat joitain tärkeimpiä prosesseja, joita on säädeltävä tarkasti hyönteisen elämänvaiheiden välillä.³⁶⁻³⁸

2.4.1 Hyönteisten frassi

Hyönteiset muuttavat kasvibiomassaa hyönteisbiomassaksi. Kasvibiomassan muuntaminen biomassaksi on erittäin tehokasta. Hyönteistuotanto itsessään tuottaa myös jätevirran, joka koostuu hyönteisten osista ja ulosteista. Hyönteisten jätevirtaa kutsutaan frassiksi.³⁹

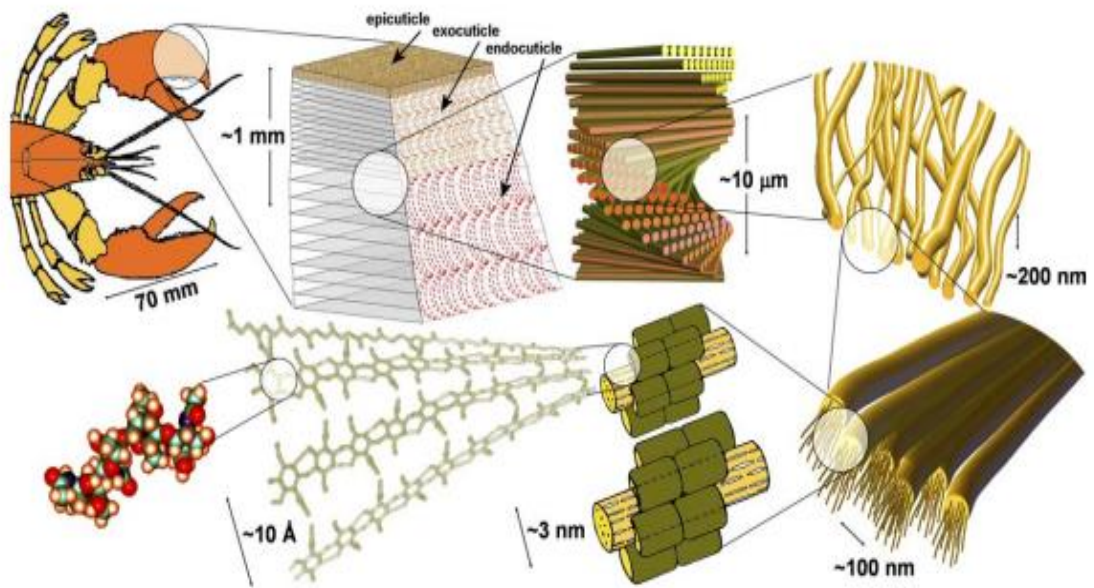
Frassin kemiallinen karakterisointi osoittaa, että frassin typpi-, kalium- ja fosforipitoisuudet (N, K ja P) ovat yhtä korkeat kuin maatalouden näkökulmasta on lannassa ja erityisesti siipikarjan lannassa. Lisäksi frassi sisältää myös mikroravinteita, kuten kuparia (Cu) ja sinkkiä (Zn). Frassilla on kerrosmainen rakenne. Ravinteet P, K ja kalsium (Ca) ovat tasaisesti jakautuneena frassin orgaanisessa aineessa. Tämä viittaa eristettyjen mineraalifaasien puuttumiseen, mikä voisi mahdollisesti johtaa frassin ravinteiden vapautumiseen. Tällöin ravinteiden vapautuminen frassista sen jälkeen, kun se on lisätty maaperään, olisi homogeenista ja mahdollisesti pitempiketoisempaa kuin lannoitteissa, joissa ravinteet jakautuvat epätasaisesti.³⁹

2.4.2 Merieläinten kitiinirakenne

α -kitiini on runsain kitiini luonnossa ja sitä esiintyy muun muassa ravuissa ja katkaravuissa. Noin 75 % rapujen ja katkarapujen osista luetaan jätteeksi, ja tällaisen jätteen kuivapainosta kitiini kattaa 20 - 58 %. β -kitiiniä on luonnossa muun muassa mustekalojen sisäisessä tukirakenteessa. Sienet ja hiivat sisältävät γ -kitiiniä.⁴⁰

Niveljalkaiset ovat suurin eläinlaji. Niihin kuuluvat trilobiitit, kelikeraatit, myriapodit, heksapodit ja äyriäiset. Suurin niveljalkaisten ryhmä on äyriäisten luokka, joka koostuu noin 30000 lajista. Äyriäisiä ovat esimerkiksi eliöt, kuten katkaravut, ravut ja hummerit. Äyriäisillä on eksoskeletoni, joka on valmistettu polysakkaridikitiinistä ja kalsiumkarbonaatista (CaCO_3). Tämä ulkokuori suojaa ja tukee lihasten kiinnittymistä. Äyriäisten kasvaessa niiden ulkokuori, eksoskeletoni, ei kasva niiden mukana, joten niiden on säännöllisesti irrotettava nämä kuoret kasvattaakseen kokoa. Epikuta on ohut, vahamainen kerros, joka on tärkein vettä eristävä kerros. Epikulaarin eli rakennekerroksen alapuolella on pää rakenne, joka on ensisijaisesti suunniteltu vastustamaan mekaanisia kuormia. Rakenne on edelleen jaettu kahteen osaan, ulompi ja sisempi, joilla on samanlainen koostumus ja rakenne. Sisempi osa muodostaa noin 90 tilavuusprosenttia eksoskeletonista. Ulko-osa on pinottu tiheämmin kuin sisäosa. Kerrosten välinen etäisyys vaihtelee lajeittain. Äyriäisten eksoskeletonin osuus on noin 35–60 %. Äyriäisjätteet sisältävät noin 10 - 25 % kitiiniä kuivapainosta.⁴¹

Rakenteet toistuvat muodostaen ekso- ja endokutikkelin (kuva 5). Sama Bouligand-tyyppinen rakenne on ominaista myös kompaktin luun kollageeniverkostoille, kasvien soluseinien selluloosakuiduille ja muille kuitumateriaaleille. Ravun eksoskeletoneissa mineraalit ovat kalsiitin (CaCO_3) tai amorfisen kalsiumkarbonaatin muodossa, jotka kerrostuvat kitiini-proteiinimatriisiin. Pinnassa on hyvin kehittyneitä, suuren tiheyden omaavia huokoskanavia, jotka sisältävät pitkiä, taipuisia putkia ja tunkeutuvat eksoskeletonin läpi. Näillä putkilla on tärkeä rooli ionien kuljetuksessa ja ravinnossa uuden eksoskeletonin muodostumisen aikana.⁴²



Kuva 5. Eksoskeletonin rakenteen muodostuminen.⁴³

Kuvassa 5 N-asetyyliglukosamiinimolekyyleistä muodostuu α -kitiinisäikeitä. Proteiinien liittyttyä kitiiniin muodostuu nanofibrillejä, jotka rakentuvat kitiini- ja proteiinikuiduiksi ja ne on järjestetty vaakasuoriin tasoihin. Tasot muodostavat kierteisen rakenteen. Yhdistettynä CaCO_3 :iin, kuten äyriäisten ja nilviäisten kuorissa, kitiini tuottaa vahvan komposiitin. Tällainen komposiittimateriaali on paljon kovempaa ja jäykempää kuin puhdas kitiini ja on sitkeämpi ja vähemmän hauras kuin puhdas CaCO_3 .⁴³

3 KITIININ JA SEN HAJOAMISTUOTTEIDEN ANALYTIikka

Kitiinin molekyylipaino voi olla 1000 kDa. Kitosaanin molekyylipaino vaihtelee lähteen ja käytetyn deasetylointikäsittelyn mukaan. Äyriäisistä tuotetun kitosaanin molekyylipaino vaihtelee välillä 100 - 1000 kDa. Hyönteisistä tuotetun kitosaanin molekyylipaino on välillä 26 - 300 kDa. Hyvin matalia arvoja (3 ja 7 kDa) on myös raportoitu.⁴⁴

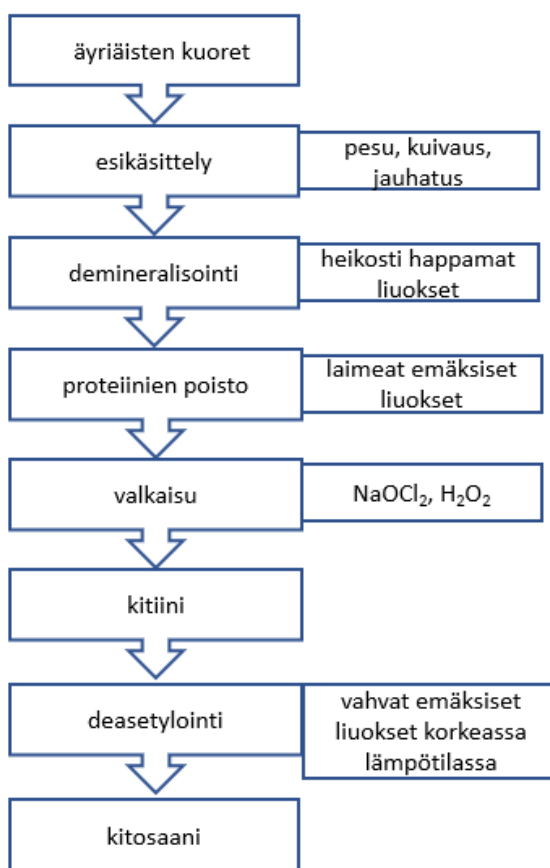
Deasetylaation reaktio-olosuhteet voivat vaikuttaa kitosaanin molekyylipainoon ja siten sen fysikaaliskemiallisiin ominaisuuksiin ja bioaktiivisuuteen. Molekyylipainolla on suuri vaikutus kitosaanin biologiseen aktiivisuuteen. Esimerkiksi pienellä molekyylipainolla (alle 150 kDa) olevalla kitosaanilla on hyvät antibakteeriset ominaisuudet. Tutkimukset, jotka on tehty ihmisille patogeenisillä bakteereilla, kuten *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ja *E. coli*, ovat vahvistaneet, että pienimolekyylipainoisella kitosaanilla on suurempi vaikutus mikro-organismien kasvun ja lisääntymisen vähenemiseen. Lyhyillä kitosaaniketjuilla on suurempi liikkuvuus, vetovoima ja ioninen vuorovaikutus kuin pitkillä ketjuilla, mikä helpottaa kitosaanin tehokasta sitoutumista bakteerien kalvopintoihin.⁴⁴

Kitiinin ja kitosaanin soveltuvuuden arvioimiseksi haluttuihin sovelluksiin ne on karakterisoitava. Kitiinin ja kitosaanin ominaisuuksien, kuten deasetylaatiaoasteen, molekyylipainon, viskositeetin, morfologian ja liukoisuuden, arvioimiseksi voidaan käyttää useita analyysimenetelmiä. Analyysimenetelmät ja tutkitut ominaisuudet vaihtelevat lopullisen tarkoituksen mukaan. Ennen analysointia kitiini on eristettävä lähteestään sekä puhdistettava, jotta analyysi olisi luotettava.⁴⁴

3.1 Kitiinin puhdistaminen

Kitiinille voidaan suorittaa erityyppisiä puhdistusprosesseja, kuten fysikaalisia, bioteknologisia ja kemiallisia menetelmiä ja näiden yhdistelmiä. Fysikaalisia tekniikoita, kuten murskaamista ja sekoittamista, käytetään rinnakkain kemikaalien tai katalyyttien kanssa. Kitiinin biotekninen uuttaminen ja deasetylointi ovat ympäristöystävällisempi vaihtoehto kemiallisille prosesseille. Biotekniset menetelmät perustuvat pääasiassa mikrobiproteaasien tai kokonaisten mikro-organismien käyttöön proteiinien poistamisessa

ja deasetylaasien käyttöön kitiinin deasetyloinnissa. Tähän mennessä kehitetyt bioteknologiset prosessit tuottavat kuitenkin alhaisempia saantoja, ovat aikaa vieviä ja johtavat matalamman puhtausasteen tuotteisiin. Kemialliset menetelmät kitiinin uuttamiseksi hyönteisten eksoskeletteista ovat samanlaisia kuin merieläimistä peräisin olevan kitiinin menetelmät (kuva 6).^{44,45}



Kuva 6. Teollinen prosessi kitiinin puhdistamiseksi ja kitosaanin tuottamiseksi äyriäisten kuorista. Muokattu lähteestä.⁴⁴

Ennen kitiinipuhdistusprosessia hyönteisnäytteet yleensä esikäsitellään. Esikäsitelyihin kuuluu puhdistus vedellä ja pesuaineella, kuivaus uunissa tai ympäristön lämpötilassa ja jauhaminen jauheeksi epäpuhtauksien erottelemiseksi. Rasvanpoistovaihe voidaan tarvita, erityisesti niille hyönteisnäytteille, joissa on runsaasti lipidejä, kuten kokonaisille toukille. Toukat voidaan keittää ja siirtää suulakepuristimen tai öljypuristimen läpi puhdistamattoman

kitiinin erottamiseksi nestefraktiosta, joka sisältää pääasiassa lipidejä ja joitakin proteiineja.⁴⁴

Seuraavaksi mineraalit poistetaan laimennetuilla hapoilla esimerkiksi suolahapolla (HCl) tai etikkahapolla (CH₃COOH). Proteiinien poisto tapahtuu emäksisillä käsittelyillä, pääasiassa laimennetulla natriumhydroksidiliuoksella. Katkaravun kuorille kaksivaiheinen puhdistus voidaan suorittaa päinvastaisessa järjestyksessä vaikuttamatta kitinin ominaisuuksiin. Lisävalkaisuvaihe voidaan suorittaa jäljelle jääneiden pigmenttien poistamiseksi ja puhdistetun kitinin värin parantamiseksi käyttämällä esimerkiksi natriumhypokloriittia (NaOCl), asetonia (CH₃COCH₃) ja vetyperoksidia (H₂O₂).⁴⁴

Hyönteisnäytteiden demineralisointi käsittää mineraalien hajoamisen vastaaviksi vesiliukoisiksi suoloiksi. Liukoiset suolat voidaan erottaa kitinistä suodattamalla ja pesemällä kiinteä faasi. Happokäsittely vapauttaa myös katekolyhdisteitä ja johtaa biomassan värimuutokseen. Kloorivetyhappo (HCl) on edullisin reagenssi, jota käytetään hyönteisten eksoskeletoneiden demineralisointiin. Orgaaniset hapot esimerkiksi maitohappo (CH₃CHOHCOOH), etikkahappo (CH₃COOH) ja oksaalihappo ((COOH)₂) voivat olla vaihtoehto suolahapolle hyönteisten biomassan demineralisoinnissa. Orgaanisten happojen käytöstä on myös muita etuja. Ne ovat vähemmän haitallisia ympäristölle, voivat säilyttää puhdistetun kitinin ominaisuudet, voidaan tuottaa edullisesta biomassasta ja uutettuja orgaanisia suoloja voidaan käyttää muihin sovelluksiin. Kun mineraalit on liuotettu ja poistettu, hyönteisten biomassa pestään tislattulla vedellä, kunnes sen pH palautuu neutraaliksi.⁴⁴

Hyönteisten biomassan deproteinoituminen saavutetaan tavallisesti alkalisilla liuoksilla. Äyriäisnäytteillä on testattu laaja valikoima kemikaaleja deproteinsaatoreagensseina, mukaan lukien natriumhydroksidi (NaOH), natriumkarbonaatti (Na₂CO₃), natriumbikarbonaatti (NaHCO₃), kaliumhydroksidi (KOH), kaliumkarbonaatti (K₂CO₃), kalsiumhydroksidi (Ca(OH)₂), natriumsulfiitti (Na₂SO₃), natriumbisulfiitti (NaHSO₃), trinatriumfosfaatti (Na₃PO₄) ja natriumsulfidi (Na₂S). Deproteinoinnin tehokkuus riippuu emäksen, kiintoaineen ja liuottimen suhteellisista määristä, sekä käsittelyn ajasta ja lämpötilasta. Natriumhydroksidi on eniten käytetty reagenssi äyriäisten ja hyönteisten biomassan proteiinien poistoon kitinin teollisessa tuotannossa.⁴⁴

Hyönteisten kitiniillä on ruskehtava ulkonäkö. Kaupallisissa tarkoituksissa kitinin ja kitosaanin värin on oltava mahdollisimman valkoinen. Täten käytetään lisävalkaisuvaihetta

jäljellä olevien pigmenttien poistamiseksi ja kitiinin ja siten kitosaanin värin parantamiseksi. Teollisiin menetelmiin kitiinin puhdistamiseksi äyriäisjätteistä sisältyy natriumhypokloriitin (NaClO) tai vetyperoksidin (H₂O₂) käyttö valkaisuaineina. Kun valkaisuvaihe on saatu päätökseen, kitiini kuivataan ja karakterisoidaan sen soveltuvuuden tutkimiseksi haluttuun käyttötarkoitukseen. Muuten kitiini voidaan deasetyloidä kitosaanin tuottamiseksi.⁴⁴

3.2 Kitiinin deasetylointi kitosaaniksi

Deasetylointi kitiinistä kitosaaniksi suoritetaan yleensä inertissä kaasukehässä ja lämmittämällä kitiiniä väkevässä natriumhydroksidiliuoksessa. Kitiinin deasetylointi voidaan suorittaa joko heterogeenisesti tai homogeenisesti. Heterogeenisessä menetelmässä kitiiniä käsitellään yleensä väkevällä natriumhydroksidiliuoksella muutaman tunnin ajan yli 100 °C:ssa. Homogeenisen menetelmän puitteissa kitiiniä lämmitetään väkevässä natriumhydroksidiliuoksessa huoneenlämpötilassa muutaman tunnin ajan, minkä jälkeen se liukenee murskatussa jäähauteessa (0 °C). Heterogeeniset olosuhteet johtavat N-asetyylin epäsäännölliseen jakautumiseen. D-glukosamiiniyksiköt ja asetyyli ryhmät jakautuvat lohkoon kitosaaniketjussa. Sitä vastoin homogeenisissa olosuhteissa saadulla kitosaanilla on satunnainen asetyyli ryhmien jakauma ketjussa. Näillä kahdella menetelmällä valmistetuilla kitosaaneilla voi olla erilaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet.⁴⁴

Lähes yksinomaan kemiallisesta heterogeenisestä deasetylaatiosta on raportoitu kitosaanin tuotannossa hyönteisten osalta, joissa deasetylointiaineena käytetään natriumhydroksidia. Joissakin tapauksissa natriumhydroksidi yhdistettiin natriumboorihydridin (NaBH₄) kanssa suojareagenssina. Ihannetapauksessa deasetyloinnin tulisi johtaa hajoamattomaan kitosaaniin, jolla on korkea deasetylaatioaste, mikä mahdollistaisi sen liukenemisen laimeaan happamaan liuokseen.⁴⁴

3.3 Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden analyyttiset menetelmät

Luonnossa kitiiniä ei esiinny puhtaassa muodossa, vaan nano-organisoiituneina kitiiniproteiineina, kitiinipigmentteinä tai kitiinimineraaliyhdistelmä materiaaleina, mikä vaikeuttaa sen tunnistamista. Näin ollen erittäin herkkien analyyttisten menetelmien kehittäminen kitiinin tunnistamiseksi on ratkaisevan tärkeää nykyaikaisen kitiiniin liittyvän

tekniikan edistämiseksi. Kitiinin tunnistamiseen ei ole olemassa yksittäistä menetelmää ja täydellisen analyttisen tiedon saamiseksi kitiinin toteamiseksi tulisi käyttää useita menetelmiä.⁴⁶

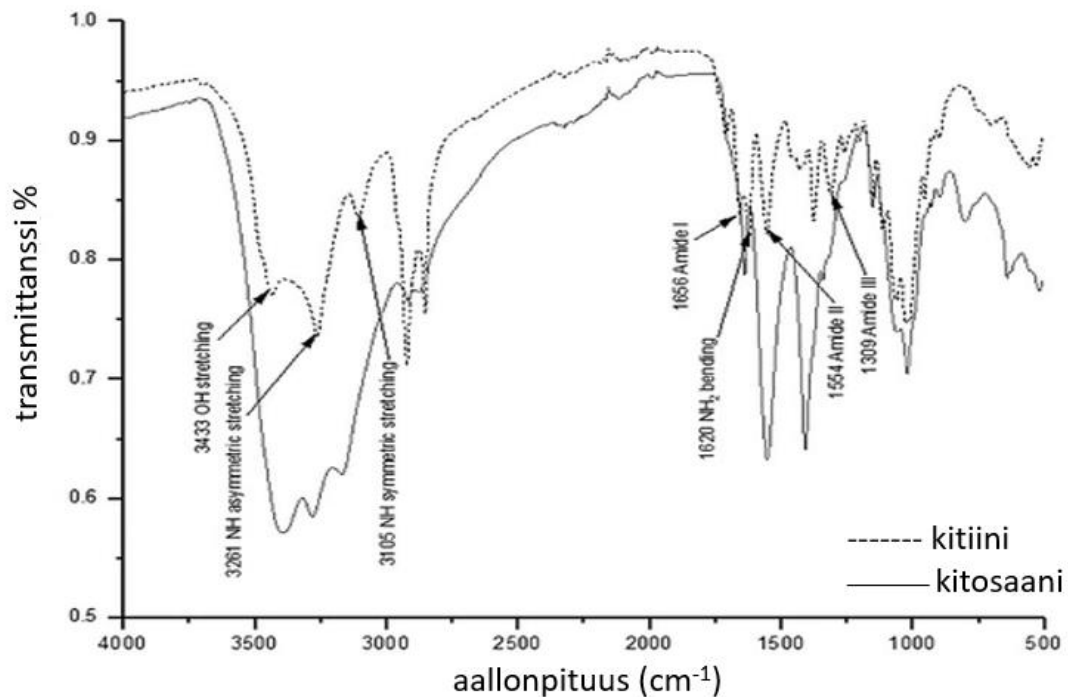
Rakenneanalyysitekniikoita, kuten ultraviolettivaloa / näkyvää valoa (UV-Vis, Ultraviolet-Visible light), infrapunasäteilyä (IR, Infrared), ydinmagneettista resonanssi (NMR, Nuclear magnetic resonance) spektroskopiaa ja massaspektrometriaa (MS), käytetään laajasti kito-oligosakkaridien rakennetutkimuksessa. IR-spektroskopialla voidaan karakterisoida kitiinin tai kitosaanin rakennetta ja N-asetyloinnin astetta. UV-Vis-spektroskopia pystyy määrittämään kitiinin ja kitosaanin muodostumisen havaitsemalla GlcNAc- ja GlcN-tähteet, jotka ovat kaukana UV-kromoforisista ryhmistä. Taulukossa 1 esitetään yhteenveto hyönteispohjaisen kitiinin ja kitosaanin karakterisointiin sovelletuista päämenetelmistä.^{23,44}

Taulukko 1. Kitiinin, kitosaanin ja dGlcN:n määrittämenetelmät

Fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet	Analyttiset määrittämenetelmät
Kitiinin ja kitosaanin deasetyloaatioaste	FTIR (eksitaatio, vibraatio). Titrausmenetelmä (happo - emäs titraus)
Kitiinin polymorfinen muoto ja kiderakenne	Röntgenspektroskopia
Kitiinin polymorfinen muoto ja kitiinin ja kitosaanin puhtaus	Termogravimetrisen analyysi
Kitiinin ja kitosaanin deasetyloaatioaste	Alkuaineanalyysi
Molekyyli­massan määrittäminen	Ubbelohde viskosimetri, geelipermeaatiokromatografia
Kitiinin pinnan morfologia	SEM, pyyhkäiselektronimikroskopia ja HRTEM, lähetys­elektronimikroskopia
Kitiinin hydrolyysituotteen dGlcN:n määrittäminen	Kromatografiset- ja elektroforeettiset menetelmät: HPLC, HPLC-MS, HCPC, ESI-MS
Deasetyloaatioasteen, asetyyli­ryhmien jakautuminen ja epäpuhtauksien määrittäminen	NMR-spektroskopia
dGlcN:n tunnistaminen	Kitinaasitesti

3.3.1 Kitiinin ja kitosaanin deasetylaatioasteen määrittäminen infrapunaspektroskopiolla ja titrauksella

Infrapunaspektroskopia on yleisimmin käytetty menetelmä hyönteisten kitiinin ja kitosaanin tutkimuksessa. FTIR:llä (Fourier Transform Infrared) määritetään erityisesti polysakkaridien deasetylaatioastetta sekä α -, β - ja γ -muotoa. Molekyylien sisältämien funktionaalisten ryhmien mukaan merkittävimmät hyönteispohjaisen kitiinin ja kitosaanin vyöhykkeet esiintyvät (kuva 7) spektrilueilla $1310\text{--}1320\text{ cm}^{-1}$ (CN-venytys, amidi), $1550\text{--}1560\text{ cm}^{-1}$ (NH-taivutus, amidi), $1590\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ (NH₂-taivutus), $1650\text{--}1655\text{ cm}^{-1}$ (CO-venytys, amidi), $3100\text{--}3110\text{ cm}^{-1}$ (NH-symmetrinen venytys), $3255\text{--}3270\text{ cm}^{-1}$ (NH-epäsymmetrinen venytys) ja $3430\text{--}3450\text{ cm}^{-1}$ (OH-venytys). Infrapunaspektroskopia antaa yksityiskohtaista tietoa amidi- ja amiiniryhmien läsnäolosta ja on siten yksi yleisimmistä menetelmistä asetylaatioasteen kuvaamiseksi kitiini- ja kitosaaninäytteiden osalta. ATR-FTIR (Attenuated total reflection) antaa hyvän piikkien erotuskyvyn monimutkaisille näytteille, joilla on pieni kitiinipitoisuus. ATR-yksikkö mahdollistaa IR-spektrin mittaamisen suoraan kiinteästä näytteestä ilman KBr-tabletin eli kaliumbromiditabletin valmistusta.^{44,47}



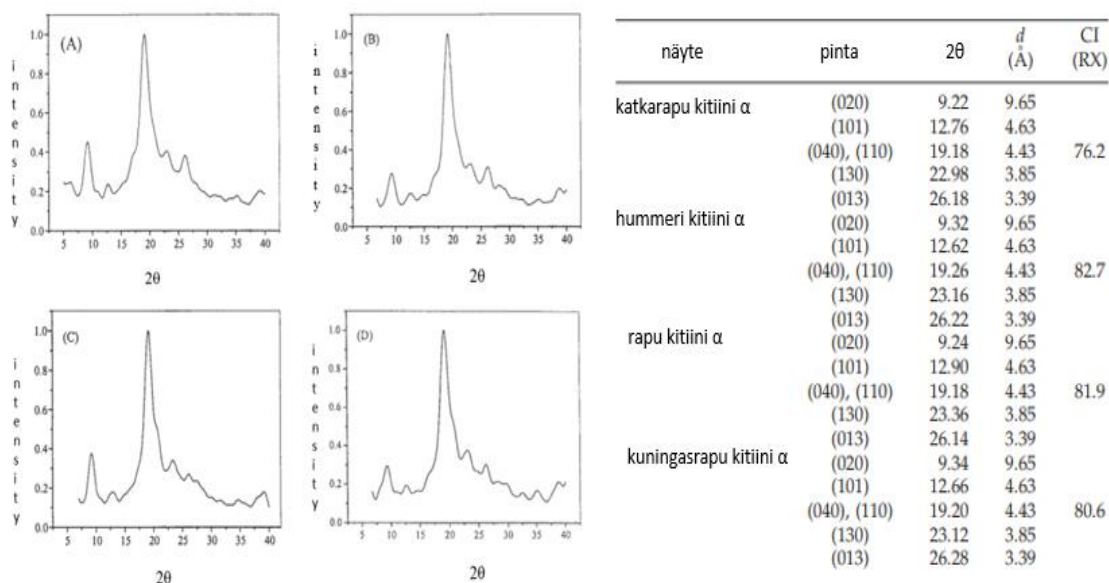
Kuva 7. FTIR:n antamat kitiinin ja kitosaanin infrapunaspektrit. Muokattu lähteestä.⁴⁴

Potentiometrisessä titrauksessa kitosaani liuotetaan HCl-liuokseen. Liuos titrataan NaOH-liuoksella, kunnes pH arvo on 2,0. Titrauksen vaiheista saadaan tehtyä käyrä, josta voidaan määrittää deasetylaatioaste. Potentiometrinen titraus on luotettava menetelmä, kun sitä on verrattu muilla menetelmillä tehtyihin deasetylaatioasteen määrityksiin. Titrausmenetelmällä saadaan samanlaisia tuloksia kuin muillakin menetelmillä deasetylaatioastetta määritettäessä.⁴⁸

3.3.2 Röntgenpohjaiset analyysimenetelmät kitiinin polymorfisen muodon ja kiderakenteen osalta

Röntgendiffraktio (XRD, X-ray diffraction) on toiseksi yleisin analyysimenetelmä, jota käytetään kitiinin karakterisointiin hyönteispohjaisista materiaaleista. XRD-menetelmä on tehokas tekniikka rakenteellisen tiedon saamiseksi, kuten kitiinin polymorfisen muodon sekä hyönteisistä eristetyin kitiinin ja kitosaanin kiderakenteen ja kidepitoisuuden määrittämiseen. Kuvassa 8 on esitetty eri lähteistä peräisin olevan kitiinin kuvaajat XRD:llä mitattuna sekä kuvaajien perusteella saadut rakenteelliset parametrit. CI (Crystallinity index) arvo tarkoittaa

kiteisyysindeksiä, joka on kiteisten piikkien suhde kiteisiin piikkeihin sekä amorfisiin piikkeihin nähden.



Kuva 8. XRD-kuvaajat ja kitiinin rakenteelliset parametrit; (A) jättikatkarapu, (B) hummeri, (C) katkarapu ja (D) kuningasrapu. Muokattu lähteestä.⁴⁹

Pienikulmainen röntgensäteilyn sironta (SAXS, Small-angle X-ray scattering) on menetelmä, jota käytetään muiden kitiinin tunnistamismenetelmien ohella. Menetelmä antaa käsityksen kitiinin molekyyliarakenteesta. Kitiinin rakenteen tutkimiseen on käytetty myös laajakulmainen röntgensäteilyn sirontaa (WAXS, Wide-angle X-ray scattering). Tämä menetelmä voidaan yhdistää XRD:n kanssa, jolloin se tarjoaa yksityiskohtaisemmat rakenteelliset tiedot. Esimerkiksi kitiinin kiteisistä ja amorfisista domeeneista peräisin olevien XRD:stä integroitujen intensiteettien suhteesta saadaan kiteisyysaste.^{42,50,51}

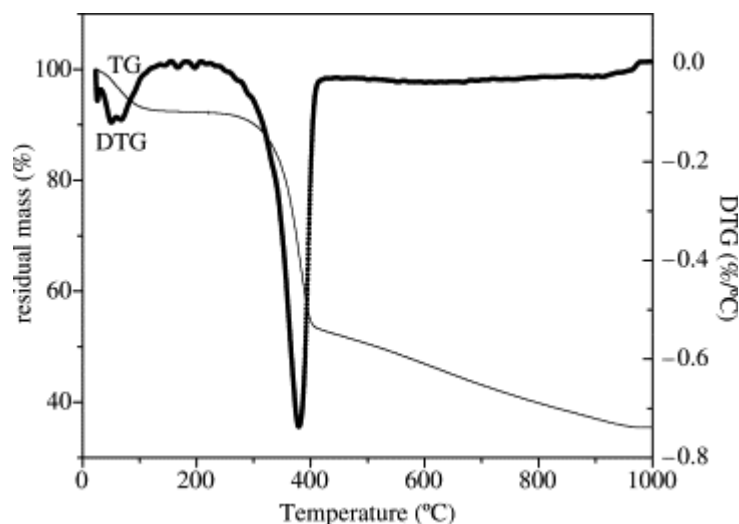
Röntgenpohjaiset menetelmät sopivat hyvin kiteisyysarvojen määrittämiseen. Hyönteispohjaiselle kitiinille ja kitosaanille saavutetut matalat kiteisyysarvot ovat erittäin tärkeitä useimmissa sovelluksissa. Esimerkiksi kitosaanin alempi kiteisyys helpottaa sen liukoisuutta happamiin liuoksiin, lisää sen sorptiokykyä ja lisää kitosaanin primaaristen vapaiden aminoryhmien saavutettavuutta.⁴⁴

Röntgenkuva antaa tietoa atomien jaksottaisesta järjestelystä näytteessä. Tuloksena oleva diffraktogrammi näyttää voimakkuuden 2θ:n funktiona, joka määrittellään tulevien ja diffraktoitujen säteiden välisenä kulmana. Hyönteisiin perustuvan kitiinin

röntgendiffraktiomittaukset paljastavat merkittäviä piikkejä 2θ arvoilla $9 - 11^\circ$ ja $19 - 20^\circ$ sekä pieniä piikkejä arvoilla $12 - 13^\circ$, $\sim 21^\circ$, $\sim 23^\circ$ ja $\sim 26^\circ$. Arvot $9 - 11^\circ$ ja $19 - 20^\circ$ ovat tyypillisiä kiteisyysarvoja kuvan 8 äyriäiskitiinille. Nämä piikit pätevät hyönteiskitiinin erittäin symmetriseen ortorombiseen kiderakenteeseen, joka edustaa α -polymorfista muotoa. γ -kitiini ja β -kitiini ovat polymorfeja, joiden järjestysaste on alhaisempi kuin α -kitiinin, mikä tekee näistä polymorfeista reaktiivisempia. β -kitiinin muuntaminen johtaa kitosaaniin, jonka kiteisyys on alhaisempi kuin kitosaanin, joka on saatu deasetyloimalla α -kitiiniä.^{7,44,52}

3.3.3 Termogravimetrinen analyysi polymorfisen muodon ja puhtauden määrittämisessä

Termogravimetristä (TGA, Thermogravimetric analysis) analyysiä käytetään hyönteispohjaisen kitinän polymorfisen muodon määrittämiseen röntgenmenetelmien ohella. TGA-analyysin avulla saatu tieto on rajallista. Toinen vaihtoehto on suorittaa kattavampi lämpöanalyysi. Uudemmat instrumentit voivat suorittaa kalorimetrisiä ja termogravimetrisiä mittauksia samanaikaisesti, jolloin saadaan lisätietoja lämmityksen aikana tapahtuvan konversiotyypin ja entalpian arvoista sekä kitinän ja kitosaanin puhtaudesta. Lämpötila, jossa kitini ja kitosaani hajoavat täydellisesti, voidaan mitata TGA-analyysillä. Menetelmä tallentaa näytteen massahäviön ajan mittaan lämpötilan noustessa ja se visualisoidaan termogrammissa (kuva 9). Hyönteiskitiinin termogrammeilla on kaksi hajoamisvaihetta. Ensimmäinen on seurausta veden haihtumisesta välillä $50 - 110^\circ\text{C}$, mikä johtaa pieneen näytteen massahäviöön ($1 - 7\%$). Toinen piikki $300 - 400^\circ\text{C}$:ssa johtuu sakkaridirungon dehydraatiosta, hajoamistuotteiden polymeroinnista ja asetyylifunktion hajoamisesta.⁵³



Kuva 9. Kitiinin termogrammi.⁵⁴

Toisen hajoamisvaiheen aikana menetetty massamäärä vaihtelee 50 - 95 %. Suurin lämpöhajoamislämpötila (DTG_{max}), mikä vastaa lämpötilaa, jolla suurin massahäviö määritetään, on kapeammalla lämpötila-alueella. DTG_{max} -arvot kitiinille esimerkiksi *Z. morion* eri ruumiinosista on arvioitu olevan 350 - 390 °C, mikä osoittaa α -muodon. DTG_{max} -arvot, jotka on saatu merieläimistä eristetyille α -kitiinille ovat yleensä samalla alueella. α -kitiinillä on tyypillisesti korkeampi toinen hajoamislämpötila kuin β -kitiinillä 385,3 °C verrattuna 334,2 °C:seen, mikä johtuu jälkimmäisen alemmasta kiteisyydestä.^{44,54}

3.3.4 Alkuaineanalyysi kitiinin ja kitosaanin deasetylaatioasteen määrittämisessä

Alkuaineanalyysiä käytetään hyönteispohjaisen kitiinin ja kitosaanin molekyylikoostumuksen ja asetyylipitoisuuden määrittämisessä. Menetelmässä analysoidaan näytteen hiilen, vedyn, typen ja hapen pitoisuutta. Kitiinin asetylaatioasteen ja hyönteispohjaisen kitosaanin deasetylaatioasteen määrittämisellä alkuaineanalyysin avulla on käytännöllistä merkitystä. Teoreettisesti täysin asetyloitu kitiini sisältää 6,9 m-% typpeä ja täysin deasetyloitu kitosaani sisältää 8,7 m-% typpeä. Mitä korkeampi typpipitoisuus on, sitä alhaisempi on asetylaatioaste ja päinvastoin. Taulukossa 2 on esitetty tyypillinen sovellus alkuaineanalyysin käytöstä kitiinin tutkimisessa. Näytteet ovat eri lähteistä ja ne on käsitelty natriumhydroksidilla (NaOH). Kitiinin saanto laskee NaOH-pitoisuuden kasvaessa. Suurempi NaOH-pitoisuus osoittaa paremman kyvyn poistaa enemmän kitiiniin kerrostuneita proteiinipitoisuuksia.^{44,55}

Taulukko 2. Kitiinin ja kitosaanin saantojen mittaaminen alkuaineanalyysillä.⁵⁵

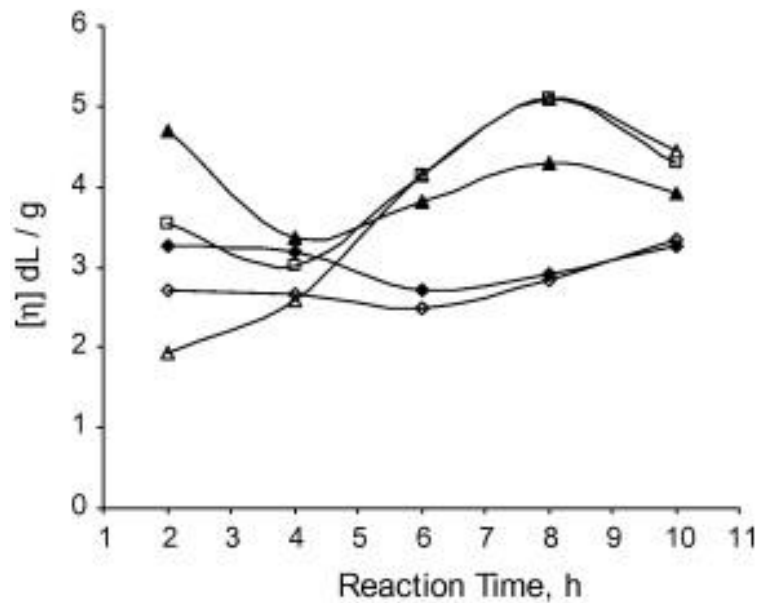
näytteet	[NaOH]	Saanto % ^a	Alkuaineanalyysit				
			% C ^a	% H ^a	% N ^a	DA%	DD%
kitiini 1	0.5 M	5.43 ± 0.17	43.27 ± 0.06	6.77 ± 0.05	6.60 ± 0.08	82.39	–
kitiini 2	1.0 M	5.22 ± 0.07	43.07 ± 0.24	6.73 ± 0.03	6.38 ± 0.04	93.83	–
kitiini 3	2.0 M	4.77 ± 0.23	43.32 ± 0.21	6.77 ± 0.02	6.29 ± 0.02	101.39	–
kitosaani 1	50 wt%	65.84 ± 1.04	42.76 ± 0.91	7.47 ± 0.25	6.55 ± 0.30	–	81.06
kitosaani 2	50 wt%	70.88 ± 0.29	42.27 ± 0.14	7.09 ± 0.06	6.76 ± 0.01	–	64.82
kitosaani 3	50 wt%	75.52 ± 0.46	42.08 ± 0.18	7.40 ± 0.13	6.56 ± 0.05	–	74.14

^a
keskiarvo ± keskihajonta

Taulukon 2 tulokset osoittavat, että kitiinin saanto laskee, kun NaOH-pitoisuus kasvaa. Suurempi NaOH-pitoisuus osoittaa paremman kyvyn poistaa enemmän kitiiniin proteiineja.⁵⁵

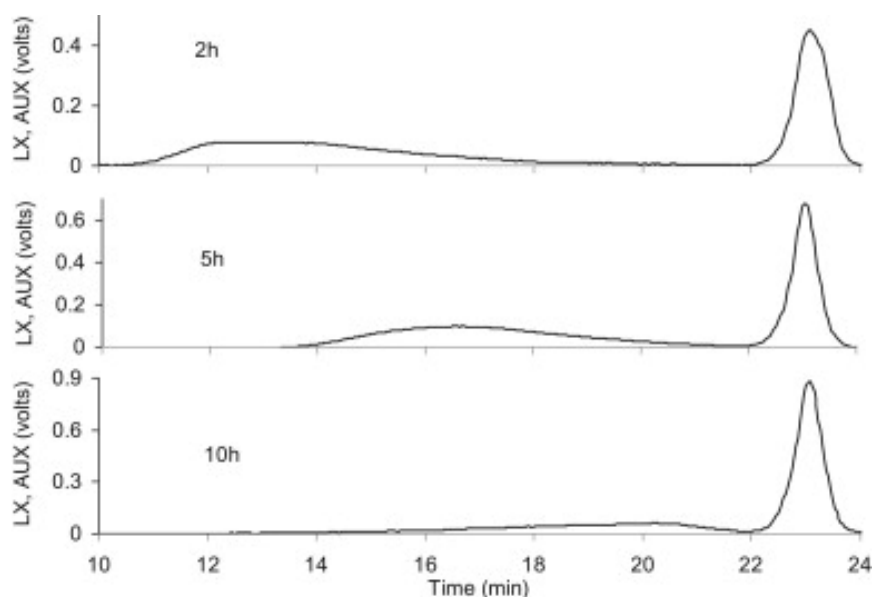
3.3.5 Molekyyli­massan määrittäminen viskosimetrillä ja geelipermeaatiokromatografialla

Hyönteisistä lähtöisin olevan kitosaanin keskimääräinen molekyylipaino voidaan määrittää mittaamalla liuoksen sisäinen viskositeetti Ubbelohden viskosimetrillä. Molekyylipainon määrittäminen perustuu siihen, että liuoksen viskositeetti deasetyloinnin asteen lisäksi riippuu kitosaanin moolimassasta. Toinen viskosimetrisovellus on kitosaanihydrolyysin etenemisen seuraaminen. Esimerkkinä tästä sovelluksesta on mehiläisperäisen kitosaanin viskositeetin keskimääräisen molekyylipainon laskun seuraaminen entsymaattisen hydrolyysin aikana lievästi happamassa liuoksessa eli 0,025 M etikkahappoliuoksessa. Kitosaanin keskimääräinen molekyylipainon määrittäminen on tärkeää, koska se vaikuttaa moniin fysikaaliskemiallisiin tai sovelluskohtaisiin ominaisuuksiin, kuten esimerkiksi bioaktiivisuuteen ja geelitymisominaisuuksiin. Ubbelohden menetelmä osoittaa viskositeetin kasvua reaktion aikana ja osoittaa sitten laskua pidemmällä kuumennusajalla (kuva 10). Suurin viskositeettiarvo on 8 tunnin kohdalla.^{44,56}



Kuva 10. Viskositeetin kehittyminen reaktion aikana Ubbelohde-menetelmällä eri kitiinilähteistä: (◆) ravun kuori, (□) sininen uimarapu-urossa, (▲) seepia, (Δ) sininen uimarapu naaras, (◇) tiikerikatkarapu.⁵⁶

Ubbelohde-viskosimetriä kehittyneempiä menetelmiä ja instrumentteja tarvitaan esimerkiksi kitosaanin keskimääräisen molekyylipainon mittaamiseen. Esimerkiksi geelipermeaatiokromatografiamittaukset (GPC, Gel permeation chromatography) taitekerroindetektorilla (RI, Refractive index) paljastivat hyönteispohjaisen kitosaanin molekyylipainon ja polydispersiteetti-indeksin. Geelipermeaatiokromatografiaa käytetään yleensä kitosaaninäytteiden molekyylimassajakauman määrittämiseen (kuva 11).⁴⁵



Kuva 11. Kitosaanin GPC RI -eluutioprofiilit.⁴⁵

Kuvan 11 kuvaajat osoittavat näytteiden intensiteetit. Matalan intensiteetin eluutiohuippu (piikki 1) eluutioaikoina ~ 11-22 minuuttia ja korkean intensiteetin eluutiohuippu (huippu 2) ~ 23 minuuttia. Molekyylit, jotka eluoituvat huipussa 1 2 tunnin reaktioaikana, M_w on $1,3 \times 10^6$, kun taas piikkiä 2 vastaavien molekyylien M_w on $3,5 \times 10^3$. Pidemmällä reaktioajoilla, 5 h ja 10 h, piikki 1 eluoituu suuremmilla eluutioajoilla, jotka vastaavat vastaavasti M_w -arvoja $9,6 \times 10^5$ ja $3,1 \times 10^5$. Piikki 2 eluoituu samalla eluutiolla, mutta intensiteetti kasvaa. Reaktion edetessä tapahtuu depolymerointia samoin kuin deasetylointia.⁴⁵

3.3.6 Kitiinin pinnan morfologian määrittäminen pyyhkäisyelektronimikroskopiolla ja muilla mikroskooppisilla menetelmillä

Pyyhkäisyelektronimikroskopia (SEM, Scanning electron microscopy) mahdollistaa polysakkaridipinnan visualisoinnin nanokokoluokan alueella käytettäessä kohdennettua elektronisuihkua. Hyönteispohjaiselle kitiinille on kuvattu erilaisia pintamorfologioita: karkeat tai sileät pinnat, joissa voi olla huokosia ja / tai fibrillejä.⁴⁴

Korkean erotuskyvyn läpäisyelektronimikroskopiaa (HRTEM, High-resolution transmission electron microscopy) käytetään yleisesti näytteiden morfologian ja rakenteellisten ominaisuuksien tutkimiseen. Lisäksi HRTEM antaa jonkin verran tietoa

näytteen konformaatiosta ja kiteisyydestä sekä auttaa yksittäisten pienten orgaanisten molekyylien rakenteiden ja reaktioiden visualisoinnissa.^{57,58}

3.3.7 dGlcN:n määrittäminen kromatografisilla ja elektroforeettisilla menetelmillä

Kitiini on liukenematon polymeeri, joten sitä ei voida suoraan tutkia kromatografisilla analyysimenetelmillä. dGlcN on ainoa kitiinin hydrolyysin tuote, jonka analyysissä voidaan käyttää kromatografisia ja elektroforeettisia menetelmiä. Menetelmillä voidaan helposti ja nopeasti osoittaa ja kvantifioida kitiinin ja kitosaanin yhteispitoisuus. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia- (HPLC, High-performance liquid chromatography) ja korkean erotuskyvyn kapillaarielektroforeesimenetelmät (HPCE, High-performance capillary electrophoresis) ovat herkimpiä tekniikoita dGlcN:lle ja vastaavasti kitiinin tunnistamiselle. Fluoresoivia- ja MS-detektoreita käyttämällä havaitaan niinkin matalat kuin pikogrammapitoisuudet. Käänteisfaasiset HPLC-menetelmät mahdollistavat dGlcN:n nopean ja kvantitatiivisen analyysin.⁴⁶

UV-detektorilla varustetussa HPLC-perusinstrumentissa dGlcN:n visualisointi vaatii derivatisoinnin fluoresoivalla molekyylillä. Tämä menetelmä on hyvin spesifinen ja herkkä. Menetelmä soveltuu biologisten materiaalien ja elintarvikkeiden kitiinipitoisuuden määrittämiseen. dGlcN voidaan tunnistaa suoraan HPLC-mittauksissa käyttäen taitekerroin (RI) -tunnistusta.⁵⁹

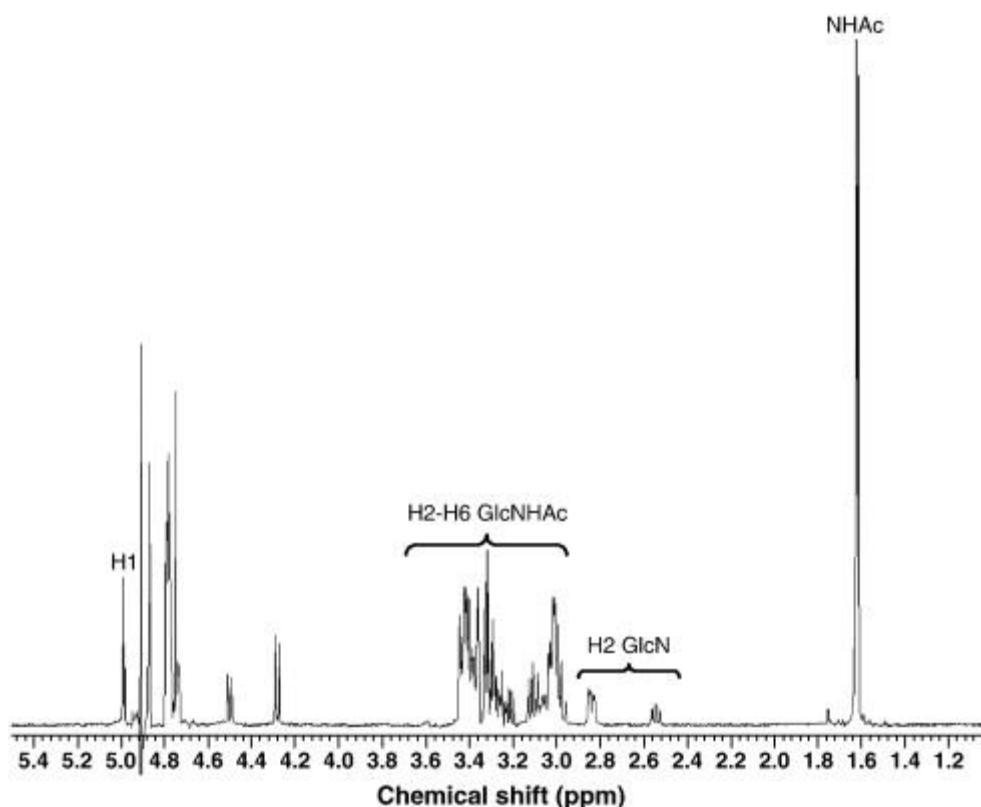
dGlcN-tunnistuksen korkea spesifisyys voidaan analysoida sähkösumutus-ionisaatio massaspektroskopiolla (ESI-MS, Electrospray ionization mass spectrometry). dGlcN:n ESI-MS-spektrit koostuvat kahdesta pääsignaalista, joiden $m/z = 162$ ja 180 vastaavat $[M - H_2O + H^+]$ -, $[M + H^+]$ - osia ja yhdestä pienemmästä signaalista, jonka $m/z = 381$ vastaa $[M_2 + H^+]$. ESI-MS-menetelmässä hydrolysoidun kitiinin luonnolliset näytteet sisältävät yleensä dGlcN:n signaalin, jossa H^+ -ioni on korvattu Na^+ :lla vastaavalla erolla m/z -signaalissa (signaali, jonka $m/z = 202$ vastaavat $[M + Na^+]$ -lajeihin).⁴⁶

HPLC-MS-instrumenttia pidetään tällä hetkellä kaikkein käyttökelpoisimpana menetelmänä dGlcN-tunnistuksessa, joten kyseessä oleva menetelmä on vakiomenetelmä kitiinin tunnistamisessa. Menetelmä antaa nopeaa tietoa näytteen puhtaudesta. Suorituskykyinen HPCE on erinomainen tekniikka dGlcN-tunnistamiseen, koska sillä on HPLC:n herkkyys, mutta lyhyempi analyysiaika verrattuna kromatografiatekniikoihin.⁴⁶

3.3.8 Kitiinin ja kitosaanin NMR-spektroskopia

Tarkka ja automatisoitava analysointimenetelmä kitiinin ja kitosaanin deasetyloinnin asteen määrittämiseksi kiinteässä tilassa tai liuenneena on NMR-spektroskopia. ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- ja ^{15}N -NMR-spektroskooppiset menetelmät ovat potentiaalisia deasetylaatioasteen, asetyyliryhmien jakautumisen ja kitiinin ja kitosaanin ristisidosten määrittämisessä. Hyönteisiin perustuvan kitiinin ja kitosaanin kaupallistamiseen NMR-spektroskopian menetelmien antama yksityiskohtainen tieto on välttämätöntä.⁶⁰⁻⁶²

Esimerkkinä NMR-spektroskooppisesta analyysistä deasetylaatioasteen (DA) määrittämiseksi kitiinille on kuvassa 12 esitetty kitiinin ^1H NMR-spektri. Yksittäinen signaali 1,6 ppm:ssä on GlcNAc:n metyyliryhmien protonien signaali. Duplettisignaalit, joita esiintyi alueella 2,5 - 2,8 ppm, ovat GlcN-yksikön H2-protonille. Multiplettisignaalit välillä 3,0 - 4,8 ppm ja singlettisignaali 5,0 ppm:ssä ovat GlcNAc- ja GlcN-yksikön H3-H6-protoneja ja vastaavasti GlcNAc-yksikön H1-protoni. Deasetylaatioaste lasketaan tuloksista yhtälön avulla.⁶³



Kuva 12. Kitiinin ^1H NMR-spektri.⁶³

Yhtälö on muotoa: $DA = (NHAc/3) / [(NHAc/3) + H2\ GlcN] \times 100$. Missä NHAc ja H2 GlcN ovat N-asetyyliryhmän kolmen protonin integraalialue ja vastaavasti glukosamiiniyksikön H2: n integraalialue. Yhtälön avulla kuvan 12 tuloksista saadaan DA-arvot $90,8 \% \pm 0,1$ and $92,4 \% \pm 0,1$.

3.3.9 dGlcN:n määrittäminen kitinaasitestillä

Kitinaasitesti (Charles Jeuniaux, 1965) on entsyymikatalysoitu kitiniä muodostavien N-asetyyli- β -D-glukosamiini- (1 \rightarrow 4) -sidosten endohydrolyysitesti. Muodostuneen dGlcN:n tunnistamista voidaan käyttää kitinin läsnäolon vahvistamiseen erityyppisissä biomateriaaleissa. Kitinaasien seos lisätään jäljittelemään luonnollista kitinolyyttistä järjestelmää. Entsymaattisen hajoamisen etenemistä voidaan seurata käyttämällä optista tai fluoresoivaa mikroskopiaa. Vaihtoehtoisesti entsymaattista hajoamista voidaan seurata dGlcN:n avulla. dGlcN voidaan havaita jollakin standardimenetelmistä: kolorimetria, spektrofotometria tai spektrofluorometria.⁴⁶

4 KASVIEN FYSIOLOGIA JA PUOLUSTUSMEKANISMIT

4.1 Kasvien fysiologia

Kasvien kehityshistoriassa kasvien on pitänyt sopeutua moninaisiin ympäristöoloihin, esimerkiksi niitä ravintonaan käyttävien selkärangattomien ja mikrobien evoluutioon. Kasvien on täytynyt optimoida kasvu-, puolustus- ja tuotantotekijät. Kasvien puolustusmekanismit ovat hyvin moninaiset hyönteisiä vastaan. Puolustusmekanismeja on suoria ja epäsuoria.⁶⁴

Kasvit ovat kehittäneet muun muassa geneettisiä ominaisuuksiaan siten, että kasvinsyöjähyönteisille altistuttuaan, kasvien transkriptionaaliset ominaisuudet reagoivat tilanteeseen. Transkriptio on tapahtuma, jossa kopioidaan DNA:ssa olevaa geneettistä koodia RNA:ksi. Transkriptio on proteiinisynteesin ensimmäinen vaihe. Kasvit aistivat tällä tavoin ympäristötekijöitä solun pinnan reseptoreilla. Reseptorit fosforyloituvat (P) aktivoituessaan. Solun sisäisen signaaliverkon avulla viestit kulkeutuvat solun tumaan. Tämä saa aikaan geenitoiminnan muutoksia, jotka sopeuttavat aineenvaihdunnan reaktioita, kasvua ja puolustusvasteita ympäristössä vallitseviin olosuhteisiin.⁶⁴

Kasviyksilön sisällä liikkuu paljon tietoa johtosolukoissa signaalimolekyylien kuljettamana. Kasvien välistä viestintää tapahtuu myös juuristoissa maanpinnan alla sienirihmastojen välityksellä. Tehokkain ja nopein tapa viestiä on ilmavälitteinen viestintä kemikaaleilla.⁶⁵

4.2 Kasvien puolustusmekanismit

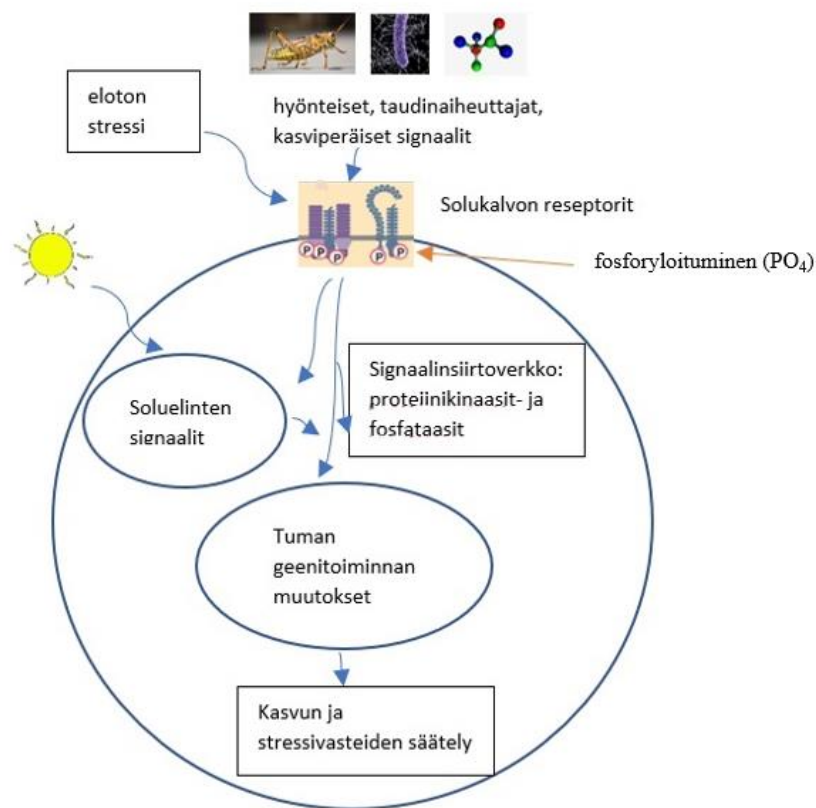
Kasveilla on suoria ja epäsuoria puolustusmekanismeja. Suoria puolustusmekanismeja kasveilla ovat esimerkiksi primääristen ja sekundääristen aineenvaihduntatuotteiden eli metaboliittien erityys, silikaatit, piikit ja karvat, sekä erilaiset ravinnoksi kelpaamattomat proteiinit. Kasvit muodostavat myös sekundaarisia metaboliitteja, jotka voivat olla ominaisuuksiltaan myrkyllisiä kasvinsyöjähyönteisille. Esimerkiksi glukosinolaatit todennäköisesti ovat sekundaarisia metaboliitteja. Epäsuoria puolustusmekanismeja ovat esimerkiksi keinot, joilla kasvit houkuttelevat kasvinsyöjähyönteisten petoja ja parasiitteja. Epäsuorat puolustusmekanismit perustuvat haihtuvien aineiden eli VOC-aineiden (Volatile

organic compounds) eritykseen, joita kasvi vapauttaa suoraan ympäristöönsä solukkojen korkean höyrynpaineen ansiosta tai nektarimaisten aineiden eritykseen, jotka houkuttelevat kasvinsyöjähyönteisten petoja paikalle. Näitä aineita ovat esimerkiksi terpenoidit, kuten isopreeni ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2$).⁶⁴

Viestinvälitysverkosto, jonka kautta kasvit reagoivat stressitekijöihin on laaja ja sisältää useita säätelytasoja. Transkriptionaaliset tekijät kuten proteiinikinaasit, jotka katalysoivat proteiinien toimintaa muokkaavaa fosforylaatiota, ovat tärkeä osa stressitilojen aikaista signaalinvälitystä. Yksi keskeisistä tekijöistä kasvien stressivastetta ja energiatasapainoa säätelevistä tekijöistä on SnRK-kinaasiperheen (SNF1-related protein kinase) jäsenet.⁶⁶

Kasvinsyöjähyönteisten tekemät ja muut mekaaniset vauriot kasveissa aiheuttavat VOC-aineiden erittymistä kasveista. Erilaisten kasvin pinnalla olevien reseptorimolekyylien (reseptorikinaasit) avulla kasvit tunnistavat esimerkiksi kasvinsyöjähyönteiset. Erilaiset reseptorikinaasit tunnistavat tiettyjä kasvihormoneja ja muita kasvisolun tuottamia signaalimolekyyliä sekä kasvia häiritseviä taudinaiheuttajia. Solukalvon läpäisevät reseptorikinaasit voivat tunnistaa muun muassa bakteerien siimojen peptidirakenteita ja sienirihmojen solunseinän kitiiniin.⁶⁷

Tutkimuksissa reseptorikinaasien on havaittu muodostavan solukalvoon oligomeerisiä komplekseja. Kompleksit koostuvat ligandin tunnistavasta reseptorikinaasista ja sitä avustavista reseptoreista. Ligandin sitoutuminen aktivoi reseptorikinaasien solunsisäisiä kinaasidomeeneja, jotka välittävät signaalin eteenpäin sytoplasmassa odotteleviin proteiinikinaaseihin. Erilaiset proteiinikinaasien muodostamat tiedonvälityskanavat sukkuloivat viestejä peräkkäisten proteiinifosforylaatioiden sarjoina ilmentyen kasvin kasvun ja stressivasteiden säätelyssä (kuva 13).⁶⁷

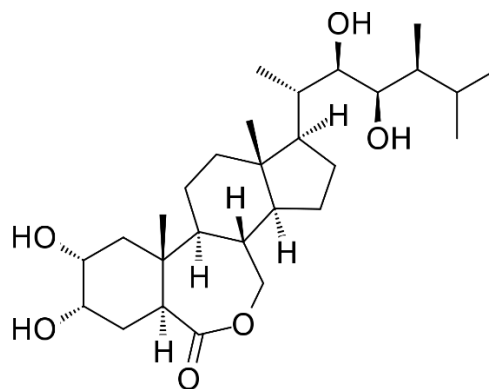


Kuva 13. Kasvien aistimis- ja sopeutumismekanismi ympäristötekijöihin. Muokattu lähteestä.⁶⁷

Kun solukalvon reseptorikinaasien lähettämät viestit välittyvät sytoplasman kautta tumaan, ne tarpeen mukaan joko aktivoivat tai hiljentävät geenejä. Tuman lisäksi reseptorikinaasien lähettämät signaalit välittyvät solun kloroplasteihin ja mitokondrioihin. Nämä toimivat kasvisoluissa aineenvaihdunnan ja soluviestinnän solmukohtina. Kloroplastien päätehtävänä on yhteyttää ilmakehän hiilidioksidia sokeriksi, mutta fotosynteesikoneisto toimii myös eräänlaisena sensorina, joka aistii ja viestittää ympäristön olosuhteissa tapahtuvia muutoksia kasvin osien välillä. Kloroplastit ja niiden välittämät signaalit ovat siten välttämättömiä myös solun immuunipuolustuksen toiminnalle taudinaiheuttajan infektoidessa kasvisolukon. Puolustusvasteen muodostuminen vaatii useiden soluelinten tarkkaa yhteistyötä. Yhteispeli tapahtuu sytoplasman signalointiproteiinien välityksellä.⁶⁷

Signaalinsiirtoverkoissa on monia mahdollisia solmukohtia, joissa samansuuntaiset tai toisiaan kumoavat viestit voivat kohdata. Myös reseptorikinaasit tarjoavat mahdollisuuden

tällaiseen vuorovaikutukseen. Esimerkiksi brassinosteroidihormonit ((22R, 23R, 24S)-2a, 3a, 22, 23-tetrahydroksi-24-metyyli-B-homo-7-okso-5a-kolestan-6-oni) säätelevät kasvien kasvua edistämällä solujen laajuuskasvua paikallisesti samassa solukossa, jossa ne syntyvät (kuva 14). Tunnistaessaan brassinosteroidin solukalvon reseptorikinaasi aktivoituu ja lähettää kasvua säätelevän viestin solun tumaan. Brassinosteroidireseptorin tiedetään säätelevän myös taudinaiheuttajia ja tuhohyönteisiä vastustavien sekundaariyhdisteiden biosynteesiä. Kloroplastit tuottavat energiaa ja monenlaisia taudinaiheuttajien ja hyönteisten elinkykyä heikentäviä yhdisteitä.⁶⁷



Kuva 14. Brassinosteroidihormoneihin kuuluva brassinolidin rakenne.

Kasvisolun näkökulmasta fotosynteesi on keskeinen hapetus-pelkistyskemian hyödyntävä aineenvaihdunnan reaktiotie, joka paitsi tuottaa kasvisolulle energiaa ja rakennusaineita myös säätelee kasvisolun kykyä sietää ympäristön aiheuttamaa stressiä. Kasvien fotosynteesimekanismi voi toimia anturina, joka viestittää ympäristössä tapahtuvista muutoksista. Ympäristön elottomat stressitekijät sekä solukalvon reseptorien lähettämät signaalit taudinaiheuttajan läsnäolon tunnistamisesta voivat saattaa fotosynteesin elektroninsiirtoketjun epätasapainotilaan, joka johtaa hapen reaktiivisten muotojen kertymiseen kloroplasteihin. Hapen reaktiiviset muodot reagoivat läheisten molekyylien kanssa aiheuttaen niissä muutoksia, joista kloroplastin viestintäkoneisto pystyy välittämään tiedon kasvisolun tumaan. Mekanismi on toistaiseksi tuntematon. Tuman genomin geenien toiminnan muutokset puolestaan ohjelmoivat kasvisolujen aineenvaihduntaa siten, että kasvuun ja kehitykseen liittyvät prosessit hidastuvat ja stressinsietokykyä parantavat

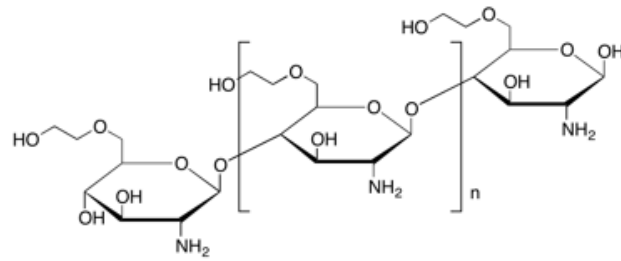
reaktiotiet aktivoituvat. Näihin reaktioteihin lukeutuvat esimerkiksi mikrobien ja tuhohyönteisten kasvua heikentävien yhdisteiden biosynteesit.^{67,68}

On huomattu myös, että muutamat kasvinsyöjähyönteisten erittämät metaboliitit saavat aikaan myös VOC-aineiden erittymistä kasveista. Tällaisia metaboliitteja ovat esimerkiksi rasvahappojen ja aminohappojen konjugaatit, kuten sulfonoidut rasvahappoderivaatat, peptidit ja entsyymiglukosidaasit. Suurin osa VOC-viestiaineista, joihin toiset kasvit ja herbivoreja ravinnokseen käyttävät pedot reagoivat, ovat pääosin terpeenejä ja niiden johdannaisia. VOC-aineisiin kuuluvat, lehdistä haihtuvat GLV- (Green Leaf Volatiles) yhdisteet ovat toinen hyvin yleinen ryhmä. GLV- yhdisteitä muodostetaan lähes kaikilla vihreillä kasveilla ja ne valmistuvat ja erittyvät nopeasti kasvinsyöjähyönteisten uhatessa.⁶⁹

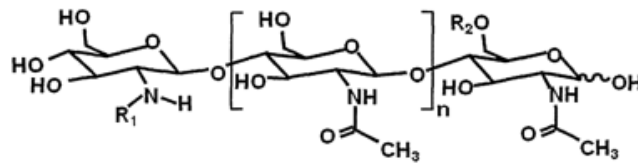
4.3 Kitinaasit patogeenien aiheuttaman stressin yhteydessä

Kasvikitinaaseilla on merkittäviä tehtäviä. Ne voivat toimia puolustusmekanismina kasvipatogeeneja vastaan. Kitinaasien ilmenemisen on yhteydessä solujen jakaantumiseen, erilaistumiseen ja kehitykseen. Kitinaasien ajatellaan osallistuvan kasvien sisäiseen viestintään vapauttamalla kito- ja mahdollisesti kitosaanioligosakkarideja signaalimolekyyleiksi kalvoreseptorien aistittaviksi. Nämä laukaisevat erilaisia vasteita, kuten proteiinien fosforylaation, ja puolustusgeenien transkriptionaalisen aktivoinnin.⁷⁰

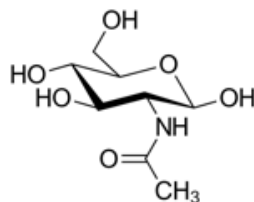
Kitinaasit ovat glykosyylihydrolaasientsyymejä, jotka katalysoivat homopolymeerisen kitiinin GlcNAc-yksiköiden pilkkoutumista glykosidisidoksistaan yleensä dimeerisiksi oligosakkarideiksi. Kitinaasisubstraattina voivat toimia kitiinin deasetyloitu muoto, kitosaani sekä kitosaanin johdannainen, glykolikitosaani (kuva 15). Muita tunnettuja kitinaasisubstraatteja ovat juurinystyrä tekijöiden lipokito-oligosakkaridit (kuva 15) ja bakteriaalinen peptidoglykaani. Bakteeriaalinen peptidoglykaani eli mureiini on β -1,4-N-asetyyliglukosamiinista ja N-asetyylimuramiinihappoyksiköstä (kuva 15) sekä 3 - 5 aminohapon peptidiketjusta koostuva polymeeri. Tämän lisäksi arabinogalaktaaniproteiinien ja muiden soluseinän glukosamiini- tai N-glukosamiinitähteen omaavien glykoproteiinien tai glykaanien arvellaan pystyvän toimimaan substraattina kitinolyyttisille entsyymeille.⁷¹⁻⁷⁷



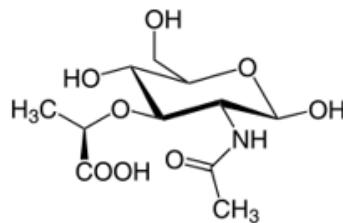
glykolikitosaanin



lipokito-oligosakkaridi



β -1,4-N-asetyylglukosamiini



N-asetyylimuramiinihappo

Kuva 15. Glykolikitosaanin, lipokito-oligosakkaridin, β -1,4-N-asetyylglukosamiinin ja asetyylimuramiinihapon rakenteet.

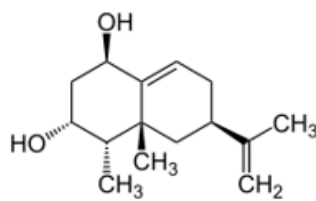
Kasvinsyöjähyönteisten tai sienitautien uhatessa, kasvi alkaa tuottaa PR-proteiineja eli patogeenisiin liittyviä proteiineja. Kitinaasien sienikasvuston leviämistä ehkäisevä vaikutus perustuu patogeenirihmaston kasvavissa kärjissä olevien paljaiden kehittyvien kristallisoitumattomien kitiiniketjujen alttiuteen kitinaasien hydrolyysille. Kitinaasien sienisoluseinästä irrottamien kito-oligosakkaridien sitoutuminen kasvin solukalvon reseptoriproteiineihin, sekä kitiinin elisitaatiovaikutus eli vuorovaikutus, laukaisevat

useiden proteiinifosforylaatioiden ketjun ja MAPK-reaktiosarjan (signaalintijärjestelmä, joka säätelee monia tärkeitä toimintoja, kuten solun jakautumista, stressivastetta, apoptoottista solukuolemaa) aktivoinnin. Lopulta ketju johtaa puolustusgeenien ilmenemiseen. Tämä johtaa hydrolyyttisten entsyymien muodostumiseen. Kasvikitinaasit voivat olla aktiivisia vasta jouduttuaan kasvinsyöjäeliön ravinnoksi ja alkavat hajottaa tuhoojan rakenteita hyönteisen suolistossa.⁷⁷

4.4 Kitiinin ja sen hajoamistuotteiden vaikutus viljelykasveihin

Viime vuosikymmeninä lisääntynyt kitiinikemian tuntemus ja merieläimistä peräisin olevien kitiinipitoisten jättemateriaalien lisääntynyt saatavuus elintarviketeollisuudesta ovat johtaneet kitiinipitoisten tuotteiden testaamiseen ja kehittämiseen monenlaisiin sovelluksiin maatalousalalla. On olemassa useita mahdollisuuksia sille, kuinka kitiini ja sen johdannaiset voivat parantaa satoa. Kasvien ravintoon ja kasvustimulaatioon kohdistuvien suorien vaikutusten lisäksi kitiinipohjaiset käsittelyt aiheuttavat kasvinsuojelua stimuloivien hyödyllisten mikrobien kasvua ja aktiivisuutta, sekä lisäävät ja vahvistavat hyödyllisten mikrobien toimintaa.

Kitosania on käytetty kasvien puolustusjärjestelmän indusoinnissa sekä sadonkorjuuta edeltävissä että sen jälkeisissä vaiheissa sieniä, bakteereja, viruksia ja muita abioottisia rasituksia vastaan. Lisäksi kitosaani parantaa tehokkaasti kasvien fysiologisia ominaisuuksia ja pidentää sadonkorjuun jälkeisten tuotteiden säilyvyyttä. Kasvien kitosaanikäsittely säätelee useita geenejä kasveissa, erityisesti kasvien puolustuksen signaalintireittien aktivoitumista. Tähän sisältyy fytoaleksiinien (kuva 16) ja patogeneesiin liittyvän proteiinin herättäminen.⁷⁸⁻⁸⁰

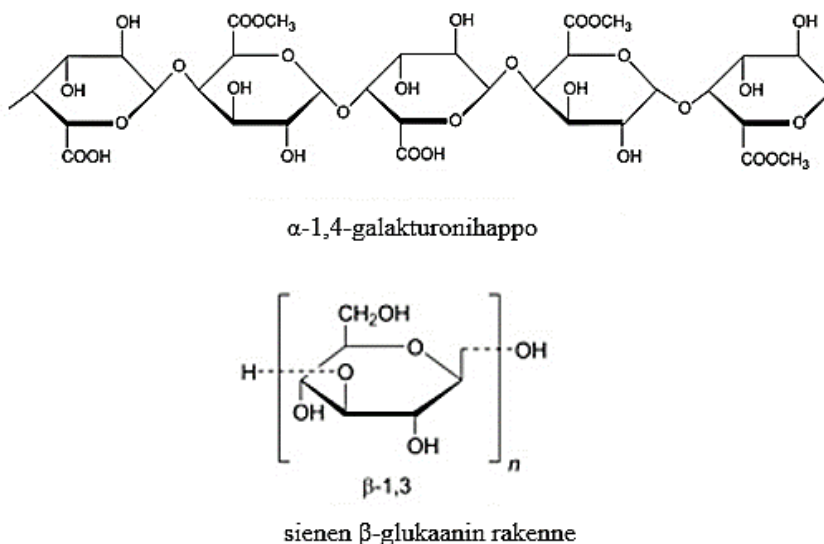


Capsidioli (fytoaleksiini)

Kuva 16. Fytoaleksiineihin kuuluva capsidiolin rakenne.

Lukuisat saatavilla olevat ja meneillään olevat kitosaanin käyttöä koskevat tutkimukset osoittavat kitosaanin tehokkuuden synteettisiin lannoitteisiin verrattuna. Kitosaanipohjainen biolannoite ja kitosaanilla päällystetty lannoite laukaisevat paremman kasvien kasvun synteettisiin lannoitteisiin verrattuna. Lisäksi kitosaani ja sen johdannaiset tarjoavat hyvän sienilääkkeiden ja sukkulamatojen eli nematoidi-aktiivisuuden, häiritsemättä maaperän hyödyllisiä mikrobeja.⁸¹

Kasvit pystyvät aloittamaan puolustuskykyiset reaktiot taudinaiheuttajan infektoihin. Nämä reaktiot laukaistaan, kun kasvi tunnistaa useita signaaliaineita, jotka vapautuvat kasvien ja patogeenien soluseinien keskinäisen entsymaattisen hajoamisen tuotteina. Tuloksena saadut oligosakkaridit eivät pelkästään toimi puolustuskyvyn ensisijaisina signaaleina, vaan vaikuttavat myös muihin kasvin kasvuun ja kehitykseen liittyviin biologisiin vasteisiin. Oligosakkaridien joukossa soluseinän pektiinien oligogalakturnidit (α -1,4-kytkettyjen galakturonihapon oligomeerejä), β -glukaanit ja sienisoluseinän kitiini- ja kitosaanifragmentit ovat potentiaalisia induktoreita resistenssille ja suojalle kasvien erilaisilta patogeeneilta (kuva 17). Tämän vuoksi ne ovat aktiivisina komponentteina useissa maatalouden suojatuotteissa.⁸²



Kuva 17. α -1,4-galakturnihapon ja sienen β -glukaanin rakenteet.

4.4.1 Kitosaanin antimikrobinen aktiivisuus ja vaikutus virustauteihin

Kitosaani on monipuolinen biostimulantti. Antibakteeristen kitosaanimekanismien on arveltu toimivan ainakin kolmella tavalla; 1. ionipinnan vuorovaikutus, joka johtaa soluseinän vuotamiseen; 2. kitosaanin tunkeutuminen mikro-organismien ytimiin estämällä niiden proteiini- ja mRNA-synteesiä ja 3. ulkoisen kalvon muodostuminen kasvin pinnalle, mikä rajoittaa mikro-organismien ravinteiden saatavuutta. Viime aikoina on huomattu, että kitosaani on vastuussa peptidoglykaanien (soluseinäkomponentti) hydrolyysistä. Kitosaani lisää elektrolyyttivuotoja ja mahdollisesti aiheuttaa tätä kautta taudinaiheuttajan kuoleman. Tutkimukset viittaavat, että kitosaania voidaan käyttää kasvin immuunijärjestelmän biostimulanttina erilaisten kasvua haittaavien ympäristötekijöiden, kuten sienien, bakteerien ja sukkulamatojen torjumiseksi.⁸³

Yleensä järjestelmällisesti kasveihin vaikuttavat virukset ovat uhkaavampia. Siksi kitosaanin käyttö virusidina eli tehoaineena viruksia vastaan on toteuttamiskelpoisin tapa virusinfektion rajoittamiseksi esimerkiksi perunan viljelyssä. Lisäksi kitosaanilla käsitellyillä tomaattikasveilla ei ollut pelkästään vastustuskykyä tomaattimosaiikkivirukselle, vaan myös niiden vegetatiivinen kasvu parani. Vastaavasti kasvien kasvua edistäviä ritsobakteereja sisältävä kitosaani antoi tomaattikasville vastustuskyvyn kiharavirusta vastaan.⁷⁸⁻⁸⁰

4.4.2 Kitosaanin vaikutukset geenien ilmentymiseen

Geeniekspressio on biologinen prosessi, joka muuttuu muuttuvan ympäristön mukaan ja mahdollistaa solujen reagoimisen ympäristön ärsykkeisiin. Erilaisista eksogeenisistä geenisäätöaineista on raportoitu viimeaikaisissa tutkimuksissa.⁸⁷

Kitosaani aktivoi geenejä ja estää RNA-synteesiä sienissä. Kitosaani aktivoi useita geenejä ja lisää proteiinien ja fenoliyhdisteiden (esimerkiksi flavonoidit, tanniinit, kumariinit, lignaanit, kinonit, stilbeenit ja kurkuminoidit) tuotantoa fenyylipropanoidireitin kautta, mikä puolestaan lisää toleranssia patogeenejä vastaan. Tutkimuksessa Limpanavech ym. todettiin, että koristekasvin (*Dendrobium*) kitosaanikäsitteily sääteli *ycf2*-geenin ilmentymistä nuorissa lehdissä, mikä tuotti suurentuneita kloroplasteja. Kitosaanilla näyttää olevan tärkeä rooli koristekasvien kukintakyvyn lisäämisessä geenireittien säätelyn avulla.⁸⁷⁻

Kitosaani indusoi kasvisolussa PR-geenit. Kitinaasi ja β -1,3-glukanaasi, kaksi PR-proteiinia, edistävät kasvinsuojelua sieni-infektiota vastaan hajottamalla sienen soluseinää. Ramkissoo ym. tutkimuksessa tomaattikasveissa kitosaaniuutteita on käytetty kahden tomaattipatogeenin, *Alternaria solanin* ja *Xanthomonas vesicatorian*, vaikutusten lievittämiseen. Tulos viittaa siihen, että kitosaani säätelisi merkittävästi *PinII* -geenin ilmentymistä, joka on vastuussa puolustusmekanismireittien aktivoinnista. Vastaavasti tutkimuksessa Wang ym. pippuri-, vadelma- ja mansikkakasveissa kitosaanin todettiin olevan tehokas kasvien puolustusmekanismien indusoinnissa kitinaasi- ja β -1,3-glukanaasi-geenien korkeamman ilmentymistason vuoksi.⁸⁹⁻⁹⁵

Rypälekasvit, jotka tutkimuksessa Feliziani ym. oli esikäsitelty kitosaanilla kolmesta eri kaupallisesti tuotetusta formulaatiosta, osoittivat suurempaa endokitinaasiaktiivisuutta ja kaksi kitosaanivalmistetta laukaisivat eksokitinaasiaktiivisuuden paremmin kuin kitosaanilla esikäsittelemättömät formulaatiot.⁹⁶

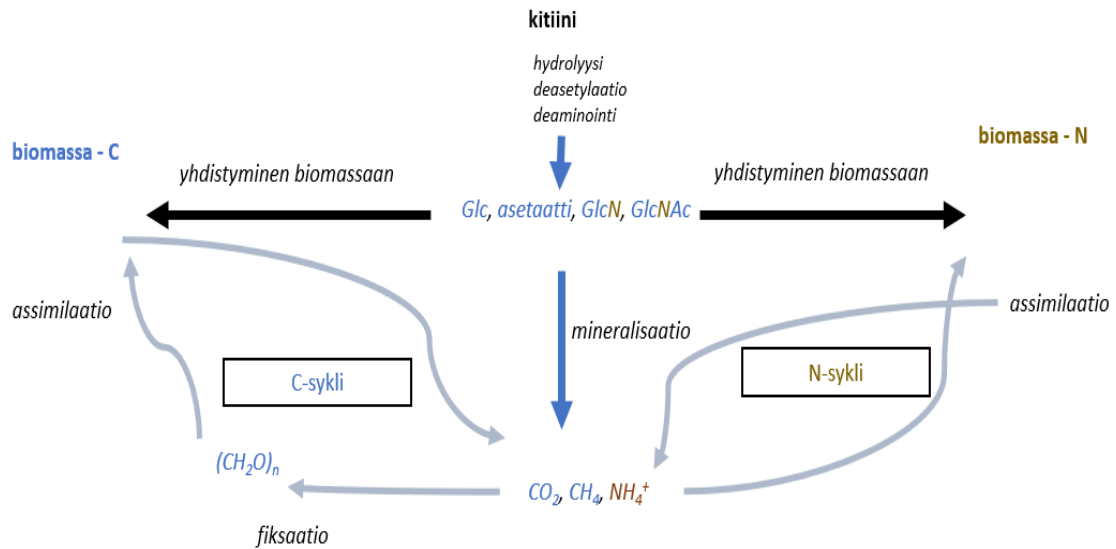
5 KITIININ JA SEN HAJOAMISTUOTTEIDEN HYÖDYNTÄMINEN LANNOITTEENA

Monet hyönteiset ovat ensisijaisesti kasvinsyöjiä, jotka poistavat typpeä kasveista. Hyönteisiin kerääntynyt typpi voi muodostaa huomattavan määrän ekosysteemin koko typpivirrasta. Hyönteiset sisältävät noin 10 painoprosenttia typpeä, jota on proteiineissa ja kitiinissä. Neliöhehtaarin alueella lauhkean ekosysteemin maaperässä on hyönteisperäistä typpeä noin 15 g ja maan päällä 100 - 200 g.⁹⁷

Hyönteiset hajoavat maaperässä helpommin kuin esimerkiksi puiden lehdet. Hyönteiset sisältävät myös suuren määrän orgaanista typpeä, joka voidaan muuntaa epäorgaaniseksi muodoiksi, kuten ammoniakiksi ja nitraateiksi. Hyönteiset voivat myös tarjota ravinteiden lähteen maaperän mikrobien hajottajille, mikä nopeuttaa lehtien luonnollisen kuivikkeen hajoamista lisäämällä maaperään vapautuneen epäorgaanisen typen määrää. Maaperän ekosysteemeissä tämä orgaaninen typpi muuttuu ammoniakiksi useilla ammonisoivilla bakteereilla, kuten *Bacillus*, *Pseudomonas* ja *Streptomyces*, minkä jälkeen bakteerit, kuten *Nitrobacter* ja *Nitrosomonas*, pystyvät hapettamaan ammoniakkin nitraatiksi. Hyönteismassan tapauksessa solunulkoiset sienihydrolyytiset entsyymit, kuten proteaasit ja kitinaasit, pystyvät hajottamaan orgaanisen typen ja muuttamaan sen kasvien käyttämään muotoon.^{98,99}

Typen kierrossa maaperässä on usein jätetty hyönteiset huomiotta typpivarastona. Monet kasvilajit ovat sopeutuneet hyönteisissä olevan typen hyödyntämiseen. Lihansyöjäkasvit ovatkin yksi tunnetuimmista esimerkeistä kasvien sopeutumisesta hyönteistypen saamiseksi. Kasvit, jotka eivät kykene entsymaattiseen / mekaaniseen pilkkomiseen, ovat kehittäneet uusia sienikumppaneita hyönteisten hyödyntämiseksi typen lähteenä.¹⁰⁰

Koska kitiinin on yksi yleisimmistä polymeereistä luonnossa, on se vuorovaikutuksessa sekä hiili- että typpisyklin kanssa (kuva 18). Kitiiniä hajottavia entsyymejä havaitaan monenlaisissa organismeissa, kuten sienissä, bakteereissa ja arkeissa. Kitiinin hajoamisen tärkeimmät ympäristötekijät on tunnistettu kemian ja biokemian näkökulmasta.¹⁰¹⁻¹⁰⁴

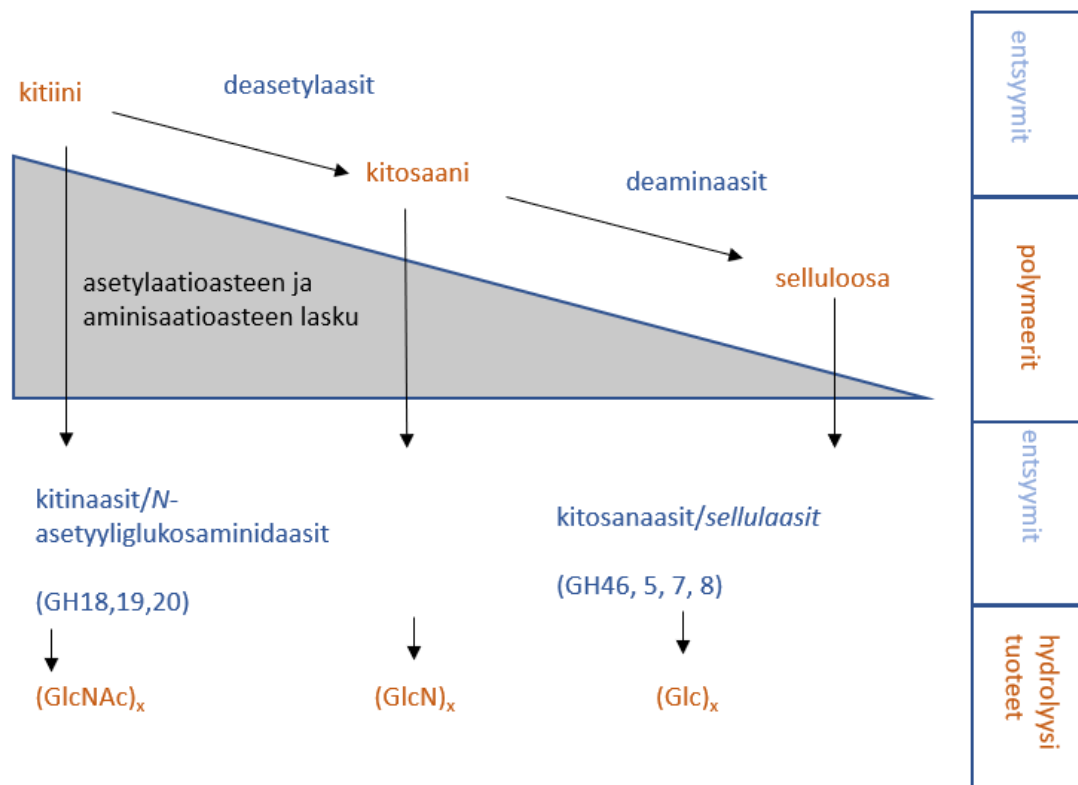


Kuva 18. Kitiinin hajoamistuotteet N- ja C-sykliden rajapinnalla. Muokattu lähteestä.¹⁰¹

Kuvassa 18 N- ja C- syklissä ensimmäisten hajoamisvaiheiden aikana kitiini pilkotaan pieniksi orgaanisiksi molekyyleiksi, kuten GlcNAc:ksi (N-asetyyliglukosamiini), GlcN:ksi (glukosamiini) ja Glc:ksi (glukoosi), jotka voidaan integroida suoraan solumateriaaliksi tai mineralisoida ja mahdollisesti poistaa järjestelmästä. Mineralisoinnin kautta pienet orgaaniset molekyylit hajoavat metaaniksi (CH₄), hiilidioksidiksi (CO₂) ja ammoniakiksi (NH₄⁺). Ammoniakki esiintyy ammonium-ionina ympäristössä.⁹⁵⁻⁹⁸

Bakteerien uskotaan olevan tärkeimmät kitiinin hajoamisen välittäjät luonnossa. Maaperässä kitiinin hydrolyysinopeuksien on osoitettu korreloivan bakteerien runsauden kanssa. Lämpötilasta, pH:sta tai hajoamisprosessin peräkkäisestä vaiheesta riippuen myös sienet voivat olla kvantitatiivisesti tärkeitä kitiinin hajoamisessa.⁹⁵⁻⁹⁸

Kitiinin hajoamiseen liittyy (1→4)-β-glykosididoksen hydrolyysi. Vaihtoehtoisesti kitiini voidaan deasetyloidä kitosaaniksi tai mahdollisesti jopa selluloosaksi, jos sille tehdään edelleen deaminaatio (kuva 19). Kitinaasit ja kitosanaasit ovat päällekkäisiä substraattispesifisyydessä, kun taas niiden vastaavaa tehokkuutta säätelee polymeerisen substraatin deasetylaatioaste. Spesifisten kitosaanien lisäksi myös sellulaaseilla voi olla huomattava kitosaanin pilkkomisaktiivisuus. Lysotsyymien on lisäksi osoitettu hydrolysoivan kitiiniä, vaikka prosessi on hidas verrattuna todellisiin kitinaaseihin.⁹⁵⁻⁹⁸



Kuva 19. Kitiinin hajoamiseen liittyvät prosessit. GH on glykosidihydrolaasiperhe, GlcNAc on N-asetyyli-glukosamiini, GlcN on glukosamiini ja Glc on glukoosi. Muokattu lähteestä.⁹⁸

5.1 Kitinolyttinen reitti

Kitiinin hajoaminen ja kierrätys ovat tärkeitä vaiheita hiilen ja typen globaalin kierron ylläpitämisessä. Yleensä ne koostuvat mikrobiologisista prosesseista, koska mikrobipopulaatio voi käyttää kitiiniä ainoana hiili- ja typpilähteenä. Kitinaaseilla on tärkeä rooli kitiinin hajoamisessa ja mahdollisesti kitiinin hyödyntämisessä uusiutuvana ravinneresurssina.³⁹

Kitiinipolymeerin täydellinen hajoaminen koostuu tyypillisesti kolmesta päävaiheesta. Polymeerin pilkkominen vesiliukoisiksi oligomeereiksi ja näiden oligomeerien jakaminen dimeereiksi, sekä dimeerien pilkkominen monomeereiksi. Kitinaasit katalysoivat yleensä kaksi ensimmäistä vaihetta. Kitinaasit ryhmitellään tyypillisesti perheiden 18 ja 19 glykosidihydrolaaseihin. Jälkimmäiset ovat harvinaisia bakteereissa.⁹⁸⁻¹⁰²

Useiden kitinaasien uskotaan johtavan yksittäisen organismin sisällä tehokkaampaan vastaavan substraatin käyttöön synergististen entsyymivuorovaikutusten tai eri substraattimuotojen vastakkaisten affiniteettien seurauksena. Esimerkiksi *Serratia marcescens* on laajasti tutkittu kitinaasijärjestelmä, joka perustuu useisiin kitinaaseihin, joilla on hieman erilaiset toiminnot. *S. marcescens* tuottaa neljä perheen 18 kitinaasia ChiA, ChiB, ChiC1 ja ChiC2, jotka kaikki vapautuvat ympäröivään väliaineeseen. Yhdistämällä ChiA, ChiB ja ChiC1 on havaittu synergistisiä vaikutuksia kitiinin hajoamiseen, mikä viittaa eri entsyymien erilaisiin toimintapaikkoihin. On osoitettu, että ChiC on ei-prosessoiva endoentsyymi, joka pilkkoo kitiinipolymeerin satunnaisesti, kun taas sekä ChiA että ChiB ovat prosessoivia entsyymejä, jotka pilkkovat disakkarideja liukumalla pitkin kitiinipolymeeriä. Useita toimintamekanismeja käytetään myös kummallekin jälkimmäiselle kitinaasille. On osoitettu, että ChiA ja ChiB hajottavat β -kitiinimikrofibrilleja yksisuuntaisesti polymeerin vastakkaisista päistä. Silti kaikkien kolmen entsyymin päätuotteet ovat disakkaridit, kun taas monosakkarideja tuotetaan sivutuotteina huomattavasti pienemmissä määrissä.¹⁰³⁻¹¹⁸

β -N-asetyyliheksosaminidaasit, jotka yleensä liittyvät perheen 20 glykosidihydrolaaseihin, pilkkovat lopulta GlcNAc:n kitinaasien tuottamien vesiliukoisten kitiinioligomeerien pelkistämättömästä päästä. Bakteereissa tämä viimeinen vaihe tapahtuu tyypillisesti sytoplasmassa tai periplasmisessa tilassa. Joissakin bakteereissa muut entsyymit kuin perheen 20 glykosidihydrolaasit ovat mukana hydrolysoimassa GlcNAc:tä kitiinioligomeereistä.¹¹⁰

Tutkimuksessa Swiontek ym. kitinolyttinen aktinomykeetti eristettiin maatalousmaasta. Se tunnistettiin *Streptomyces rimosukseksi*. Kitiinipitoisten aineiden, kuten katkaravun kuorijätteiden, rapukitiinijauheen ja kitosaanin hajoamista tutkittiin hapenkulutuksen perusteella. Entsyymi katalysoi 4-MU-(GlcNAc)₃-disakkaridi (4-metyylibelliferyyli- β -d-N,N',N'-triasetylikitotriooosi) hydrolyysiä tehokkaimmin ja luokiteltiin siksi endokitinaasiksi. Kitinaasi puhdistettiin elatusaineesta fraktioimalla ammoniumsulfaatilla ((NH₄)₂SO₄) ja affiniteettikromatografialla. Puhdistetut proteiinit tunnistettiin massaspektrometrialla. Tutkittujen bakteerien tuottaman kitinaasin aminohapposekvenssin tuloksena olevien fragmenttien analyysin perusteella suunniteltiin degeneroituneet alukset PCR:lle eli polymeraasiketjureaktiomenetelmälle. Tutkimuksen tulokset osoittavat, että *S. rimosuksen* kautta tehokkaimmin metaboloituvat aineet ovat kitosaani ja katkarapujen

kuorijätteet. Kitinolyttisen aktiivisuuden tutkimus osoitti, että katkaravun kuorijätteet olivat kitinaasisynteesin indusioijia. Puhdistetun entsyymin molekyylipaino oli 63 kDa. Kitinaasi esti sieni-fytopatogeenien *Fusarium solani* ja *Alternaria alternata* kasvustojen kasvua.¹¹¹

5.2 Kitosaani biolannoitteena

Epäorgaanisten lannoitteiden ekologinen haitallisuus on ongelma esimerkiksi suuren tuotannon ja käytön vuoksi. Siksi biohajoavat biolannoitteet, kuten kitosaani, ovat houkutteleva vaihtoehto. Kitosaani hajoaa entsymaattisesti vaikuttamatta maaperän hyödylliseen ritsosfääriin pienillä pitoisuuksillaan. Lisäksi kitosaani stimuloi kasvisymbioottisten mikrobien aktiivisuutta, mikä johtaa ritsosfääriin mikrobitasapainon muutokseen, mikä edelleen heikentää kasvipatogeeneja.¹⁰⁵

Kitosaania on käytetty biolannoitteena sadon parantamiseksi, sekä haitallisten ympäristövaikutusten vähentämiseksi. Tutkimuksessa Jail ym., kitosaanikäsittely, jonka pitoisuus oli 3,0 mg/ ml, vähensi tomaatin bakteeritaudin vaurioittamia kasvustoja jopa 85 %. Tutkimuksessa O’Herliby ym., perunan tuotannon yhteydessä tehdyissä testeissä perunan kasvustoja oli ruiskutettu 0,1 % (m/v) kitosaanikiuoksella. Tutkimuksissa havaittiin merkittävä 50 %:n lisäys mukuloiden määrässä. Tutkimuksessa Ohta ym., 1 % kitosaania sekoitettuna lannoitteeseen pidensi *Eustoma grandiflorum* juuria jopa kaksinkertaisiksi verrattuna ei kitosaanilla käsiteltyihin kasvustoihin.¹¹⁹⁻¹²¹

Tutkimuksessa Chen ym. kitosaani yhdessä N-, P- ja K-lannoitteiden kanssa osoittautui merkittäväksi yhdistelmäksi *Botrytis cinerean* aiheuttaman harmaahometaudin vaikutuksen muuttamisessa *Begonia* × *hiemalis* Fotschissa. Yhdistelmä lisäsi myös antioksidanttiaktiivisuutta ja muita kaupallisia ominaisuuksia, esimerkiksi kukkimisaikaa. Taulukossa 3 on tarkasteltu kukkimisaikaa, kukkien läpimittaa sekä kukkien painoa kitiinipohjaisella lannoitteella (T1-16) kontrolleihin nähden (C1-2). T1-16 näytteet sisälsivät erilaisia kitosaanipitoisuuksia ja kontrollinäytteissä C1-2 ei ollut kitosaania.¹²²

Taulukko 3. Kitosaanipohjaisen lannoitteen (T1-16) ja kemiallisen lannoitteen (C1-2) vertailu kukintaominaisuuksien suhteen. Muokattu lähteestä.¹²²

Koejoukko	Kukkimisaika (päivää)	Kukkien halkaisija (cm)	Kukkien paino
C1	44.00±3.74c	2.14±0.05b	9.00±0.52cd
C2	41.50±3.88b	2.15±0.03b	8.32±0.36b
T1	45.00±1.01c	2.45±0.04e	9.25±0.56d
T2	51.25±4.07e	2.60±0.03fg	9.40±0.36d
T3	37.00±1.25a	2.13±0.04b	7.20±0.67a
T4	41.75±2.15b	2.63±0.04fg	8.25±0.21b
T5	46.00±1.09c	2.32±0.02cd	9.33±0.41d
T6	47.25±1.38d	2.63±0.03fg	11.50±0.11fg
T7	49.00±1.52d	2.03±0.04a	11.00±0.12ef
T8	46.00±1.96c	2.60±0.02fg	8.75±0.21bc
T9	48.00±8.83d	2.31±0.02cd	9.20±0.43d
T10	44.75±2.87c	2.25±0.02bc	10.75±0.36e
T11	52.75±4.18e	2.69±0.05gh	17.00±0.88hi
T12	48.00±2.33d	2.57±0.01f	10.50±0.23e
T13	46.50±2.04c	2.68±0.06gh	16.50±0.38h
T14	46.81±3.48cd	2.15±0.02b	9.25±0.35d
T15	45.25±3.12c	2.35±0.04cd	10.00±0.41de
T16	51.00±3.82e	2.78±0.05i	11.20±0.58fg

Taulukosta 3 nähdään, että 60 päivän kuluttua suurin osa käsittelyistä johti merkittäviin muutoksiin kolmessa parametrissa verrattuna kahteen kontrolliin (C1 and C2). T11:ssa oli parhaimmat tulokset kaikkien kolmen ominaisuuden osalta verrattuna kontrolleihin. Esimerkiksi kukkien paino oli lähes kaksinkertainen kontrolleihin verrattuna.¹²²

Tutkimuksessa Silva ym., tulokset osoittavat biolannoitteen, joka on tehty PK-rakeista ja ktitiiniä sisältävien hyönteisten toukkien osista lisättynä diatsotrofisilla bakteereilla (NPKB), sekä sienellä *C. elegans* (NPKP) olevan tehokas edistämään tiettyjen hedelmien, kuten melonien tärkeitä kaupallisia ominaisuuksia, esimerkiksi C-vitamiinipitoisuus ja NPK:n käytön kasvua. Tutkimus osoittaa, että NPKB ja NPKP voivat olla vaihtoehtoja NPK-mineraalilannoitteelle.¹²³

Tutkimuksessa Silva ym. havaittiin, että NPKP-määrällä 12 t / ha oli suurempia ja merkittävämpiä vaikutuksia verrattuna kontrolliin, mikä johtui todennäköisesti maaperän ravinteiden saatavuudesta. Biolannoitteella (12 t / ha) saatiin parhaat tulokset kaikista liukoista aineista ja C-vitamiinista verrattuna muihin lannoitusmenetelmiin. Myös Brix-tulokset (sokeripitoisuus) olivat korkeampia melonihedelmissä, kun NPKB:tä ja NPKP:tä levitettiin enemmän (taulukko 4). Korkeammat pitoisuudet edistävät melonien kaupallisia ominaisuuksia. Taulukossa lannoitekäsittelyt ovat seuraavat: (1) = NPKP-suhde 4; (2) =

NPKP-suhde 8; (3) = NPKP-suhde 12; (4) = biolannoitteen NPKB suhde 8; (5) = NPKB-suhde 12; (6) = mineraaliliukoiset lannoitteet NPKF suositellulla määrällä; ja (7) = kontrolli (hyönteissuhde 20).¹²³

Taulukko 4. Melonista analysoidut kokonaisliukoiset aineet (TSS), kokonaishappopitoisuus (TA), C-vitamiini ja TSS / TA. Muokattu lähteestä.¹²³

Lannoitekäsitteyt t ha ⁻¹	Kemiallinen karakterisointi			
	TSS (° Brix)	TA (%)	C-vitamiini (mg 100 mL ⁻¹)	Suhde /TATSS (mg 100 mL ⁻¹)
NPKP 4	6.06 ± 0.46 ^B	0.18 ± 0.01 ^{AB}	14.29 ± 0.57 ^B	34.48 ± 0.67 ^{AB}
NPKP 8	6.95 ± 0.66 ^{AB}	0.22 ± 0.02 ^A	13.91 ± 1.04 ^B	32.23 ± 0.96 ^{AB}
NPKP 12	7.87 ± 0.58 ^A	0.19 ± 0 ^{AB}	17.57 ± 0.64 ^A	39.52 ± 1.10 ^A
NPKB 8	6.52 ± 0.63 ^B	0.20 ± 0.02 ^{AB}	13.51 ± 0.52 ^B	31.71 ± 1.53 ^B
NPKB 12	5.68 ± 0.93 ^B	0.20 ± 0.04 ^{AB}	12.41 ± 0.41 ^B	28.06 ± 1.59 ^B
NPKF*	6.62 ± 0.86 ^{AB}	0.20 ± 0.02 ^{AB}	14.28 ± 0.96 ^B	31.67 ± 0.76 ^B
Kontrolli	6.33 ± 0.42 ^B	0.16 ± 0.01 ^B	13.87 ± 0.62 ^B	38.88 ± 0.85 ^{AB}
C.V. (%)	9.82	10.52	9.85	10.02

*

Tutkimus Salachna ym. kito-oligosakkaridi (COS) yhdessä gellaanikumin ([D-Glc(β1→4)D-GlcA(β1→4)D-Glc(β1→4)L-Rha(α1→3)]_n) (taulukko 5) kanssa aiheutti *Ornithogalum saundersiae* voimakkaan kasvun, korkean antioksidanttiaktiivisuuden ja lisääntyneen polyfenolipitoisuuden, kun sipulit oli käsitelty COS:n ja gellaanikumin yhdistelmällä. Tämä viittaa vahvasti COS:n ja gellaanikumin yhdistelmän rooliin potentiaalisena biolannoitteena.¹²⁴

Taulukko 5. COS:n ja gellaanikumin vaikutus kasvuun. Muokattu lähteestä.¹²⁴

Parametrit	Päällyste				
	Kontrolli	COS + A	COS + C	COS + G	COS + X
Lehtien pituus (cm)	69.0 ± 2.0 ^d	73.8 ± 1.25 ^c	84.8 ± 0.65 ^b	88.5 ± 0.50 ^a	75.1 ± 1.55 ^c
Lehtien lukumäärä	6.25 ± 0.05 ^d	7.83 ± 0.28 ^b	8.00 ± 0.26 ^{ab}	8.50 ± 0.50 ^a	7.00 ± 0.10 ^c
Kukat auki (päivää)	80.2 ± 2.05 ^a	74.3 ± 0.98 ^c	72.0 ± 2.26 ^c	68.0 ± 1.60 ^d	77.2 ± 1.10 ^b
Kasvuston pituus (cm)	109 ± 5.51 ^d	142 ± 2.25 ^b	146 ± 4.04 ^a	149 ± 5.50 ^a	129 ± 5.51 ^c
Kukintojen määrä	7 ± 1.52 ^c	71.7 ± 1.52 ^b	80.6 ± 5.85 ^a	78.3 ± 1.53 ^a	69.0 ± 1.00 ^{bc}
Sipulien tuorepaino	156 ± 6.13 ^d	189 ± 8.14 ^c	226 ± 9.51 ^b	272 ± 7.54 ^a	191 ± 5.20 ^c
Sipulien määrä	1.17 ± 0.31 ^c	1.59 ± 0.42 ^b	1.70 ± 0.45 ^b	2.78 ± 0.68 ^a	1.42 ± 0.11 ^{bc}

Käsittelyt: Päällystämättömät sipulit (kontrolli); COS + algiinihapon natriumsuola, ruskea levä (COS + A); COS + karrageenijota (COS + C); COS + gellaanikumi (COS + G); COS + ksantaanikumi (COS + X).

Kasvuun liittyvien parametrien maksimi-arvot saavutettiin sipulilla, jotka oli päällystetty COS + G:llä (gellaanikumi). Verrokkiin verrattuna lehdet olivat pidempiä ja runsaampia (vastaavasti 28 % ja 36 %) ja ne tuottivat enemmän sipuleita, joiden tuorepaino oli suurempi (138 % ja 74 %). Lisäksi COS + G-pinnoitetuista sipuleista saadut kasvit tuottivat parasta laatua olevia kukkia, joilla oli pisimmät kukintavarret ja eniten kukkia kukintaa kohti. Biopolymeerillä käsitellyt sipulit kiihdyttivät kasvien kukintaa keskimäärin 8 - 12 päivällä päällystystyyppistä riippuen. Ensimmäisenä kukkivat kasvit saatiin COS + G:llä päällystetyistä sipulista.¹²⁴

5.3 Kitosaanipäällysteen käyttö lannoitteessa

Tärkeä näkökohta kitosaanin käytössä on lannoitteen ravinteiden vapautumisen hallinta. On arvioitu, että levitetyistä lannoitteista menetetään ympäristöön noin 40 - 70 % typpeä, 80 - 90 % fosforia ja 50 - 70 % kaliumia, eivätkä kasvit pysty hyödyntämään niitä. Tämän vuoksi lannoitteita käytetään liikaa esimerkiksi puutarhakasvien kanssa. Nitraattia pidetään myös tärkeänä veden pilaantumisen tekijänä johtuen sen osuudesta pinta- ja pohjavesien pilaantumiseen. Tämän vuoksi on tärkeää vähentää lannoitteiden käyttöä, jotta saadaan minimoitua maatalouden kielteisiä ympäristövaikutuksia. Kitosaania on käytetty päällysteenä hillitsemään epäorgaanisten lannoitteiden vapautumista, sekä rajoittamaan liiallisen lannoituksen haitallisia vaikutuksia. Kitosaanipäällysteen käyttö lannoitteissa

parantaa kasvilannoitteiden käytön tehokkuutta ja vähentää myös tuotantokustannuksia.¹²⁵⁻

130

Kasvien kasvu ja niiden laatu riippuvat pääasiassa lannoitteen ja veden määrästä. Joten on tärkeää optimoida vesivarojen ja lannoitteiden ravinteiden käyttöä. Hitaasti vapautuvista lannoitteista ravinnepitoisuudet vapautuvat vähitellen ja samaan aikaan kasvin ravintotarpeen kanssa. Nämä lannoitteet voidaan valmistaa päällystämällä perinteisten lannoitteiden rakeet erilaisilla materiaaleilla, jotka vähentävät niiden liukenemisnopeutta. Vesiliukoisten lannoitteiden vapautumis- ja liukenemisnopeudet riippuvat päällystemateriaaleista. Kitosaani on lupaava päällystemateriaali. Monissa sovelluksissa kitosaani on erittäin houkutteleva vaihtoehto sen biohajoavuuden, biologisen yhteensopivuuden ja myrkyttömyyden vuoksi.¹³¹

Hitaasti vapautuvien lannoitteiden ja superabsorboivien polymeerien optimoitu yhdistelmä voi parantaa kasvien ravintoainepitoisuuksia, lieventää vesiliukoisten lannoitteiden ympäristövaikutuksia, vähentää veden haihtumishäviöitä ja alentaa kastelun tiheyttä. Superabsorbentit ovat löyhästi silloitettuja hydrofiilisiä polymeerejä, jotka voivat absorboida ja pitää vesipitoisia nesteitä jopa tuhansia kertoja oman painonsa verran. Erinomaisista ominaisuuksistaan johtuen superabsorboivia polymeerejä on käytetty jo laajalti maataloudessa ja puutarhaviljelyssä.¹³¹

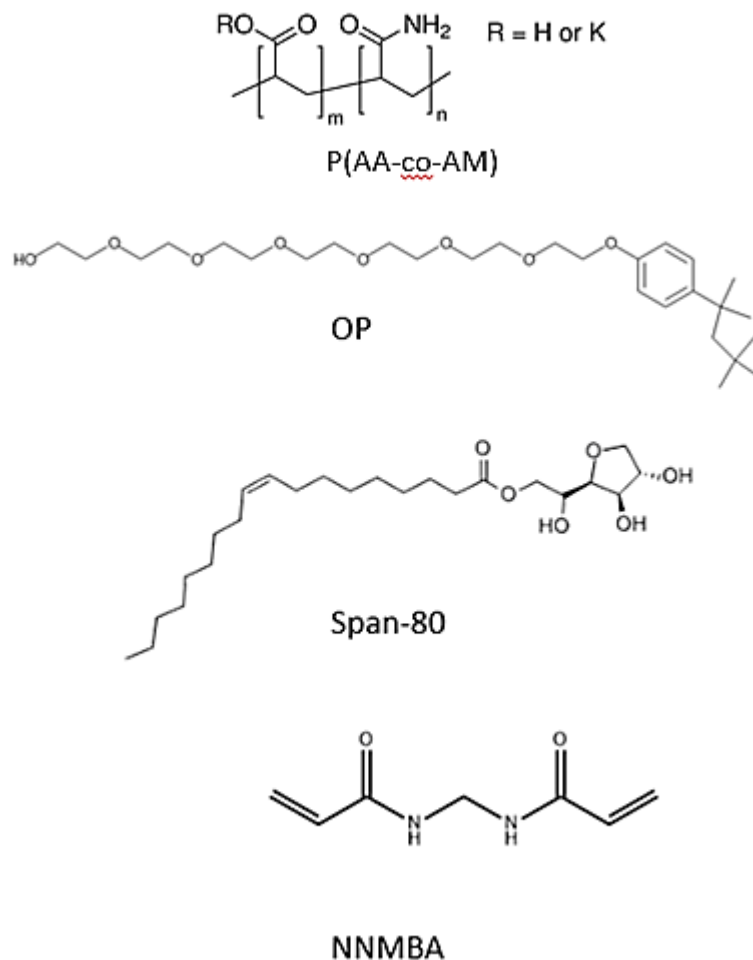
Tutkimuksessa Wu ym. tehtiin kitosaanipäällysteinen hallitusti vapautuva NPK-yhdistelmä-lannoite hyvällä vedenpidätyskyvyllä (CFCW). Lannoitteen sisempi pinnoite oli kitosaani (CTS), ja ulompi pinnoite oli poly-(akryylihapokokoakryyliamidi) P(AA-co -AM) superabsorboiva polymeeri (kuva 16). Valmistetulla tuotteella on kontrolloiva vapautumismekanismi ravinteille ja lisäksi se toimii vettä absorboivana, jolloin maaperän kosteus pysyy tasaisempana. Nämä ovat merkittäviä etuja verrattuna maatalouden normaaleihin hitaasti vapautuviin lannoitteisiin ja superabsorboiviin polymeereihin, joilla yleensä on vain rajoitetusti vapauttava ominaisuus tai vedenpidätystoiminto. Lisäksi kitosaanin päällystemateriaalin ensimmäisessä kerroksessa oli biohajoavaa materiaalia ja myös ulkopintamateriaalin AA- ja AM-kopolymeeri voi hajota maaperässä, joten päällystemateriaalit eivät olleet haitallisia maaperälle.¹³¹

CFCW:n ydin oli vesiliukoinen rakeinen NPK-lannoite, sisempi pinnoite oli CTS ja ulompi pinnoite oli P(AA-co-AM) superabsorboiva polymeeri. Alkuaineanalyysi ja atomiabsorptiospektrofotometritulokset osoittivat, että N-, P- ja K-pitoisuudet olivat

vastaavasti 8,06, 8,14 (P_2O_5) ja 7,98 (K_2O) painoprosentteja. Tuotteella haluttu lannoitteen vapautumisnopeus, koska vapautuneet ravinteet eivät ylittäneet 75 prosenttia 30 päivän aikana. CFCW:n lisääminen maaperään voisi parantaa huomattavasti maaperän vedenpidätyskykyä ja vedenpidätysominaisuuksia. Lisäksi tämä uusi lähestymistapa on osoittautunut lupaavaksi luonnonvarojen, kuten kitosaanin, hyödyntämisessä päällystemateriaalin tuotannossa. Tämä voisi vähentää merkittävästi tuotantokustannuksia ja tehdä tekniikasta melko ympäristöystävällistä. Tutkimuksen tulokset osoittavat, että CFCW:llä oli haluttu lannoitteen vapautumisnopeus, jolla oli erinomainen vedenpidätyskyky. Siksi CFCW:tä olisi hyvä käyttää maataloudessa sekä kuivien ja autiomaiden ympäristöjen uudistamisessa.¹³¹

CTS-päällystetyt NPK-lannoiterakeet valmistetaan seuraavalla tavalla: halkaisijaltaan noin 2 millimetrin seuloit NPK-yhdistelmälannoitteiden rakeet asetetaan pyörivään rumpuun ja CTS-jauhe kiinnitetään rakeisiin asetoniin liuotetun epoksin avulla. Liima levitetään ruiskuttamalla rakeisiin säännöllisin väliajoin. Prosessi saatetaan loppuun, kunnes lannoitteiden rakeisiin muodostuu kompakti ja homogeeninen pinnoite. Päällystetyt rakeet kuivataan vakiomassaksi huoneenlämpötilassa 8 tunnin ajan.¹³¹

CTS-päällystetyt NPK-lannoiterakeet lisätään pulloon, joka on varustettu mekaanisella sekoittimella, lauhduttimella ja tiputussuppilolla. Kolviin lisätään tietty määrä hiilitetrakloridia (CCl_4), polyetyleeniglykooktyylifenyylietteriä (OP) ja sorbiittianhydridin monosteariinihappoesteriä (Span-80). Lämpötila nostetaan 65 °C:seen vesihauteessa samalla, kun sisältöä sekoitetaan jatkuvasti. Sen jälkeen tietty määrä sekoitettua, osittain neutraloitua akryylihappoa (AA, ammoniakilla), akryyliamidia, N,N'-metyleenibisakryyliamidin (NNMBA) ja ammoniumpersulfaattiliuoksen (APS) seosta tiputetaan hitaasti pulloon. OP:n, Span-80:n ja NNMBA:n rakenteet on esitetty kuvassa 20. Seosta sekoitetaan 2 tuntia 65 °C:ssa, minkä jälkeen seoksen hiilitetrakloridi poistetaan suodattamalla. Seuraavaksi seosta kuivataan 70 °C:ssa uunissa. Lopputuote, kitosaanilla päällystetty NPK-yhdistelmälannoite, on hallitusti vapautuva ja sillä on hyvä vedenpidätyskyky.¹³¹



Kuva 20. P(AA-co-AM):n, OP:n, Span-80:n ja NNMBA:n rakenteet.

5.4 Hyönteisten frassin lannoituspotentialiaali

Tutkimuksessa Houben ym. suoritettiin koe, jossa maaperää muutettiin joko jauhomadon (*Tenebrio molitor* L.) frassilla (10 Mg ha⁻¹), mineraalilannoitteella (NPK) ja ravinnepitoisuutta vastaavalla frassilla tai seoksella, jossa oli 50 % NPK:ta ja 50 % toukanpurua. Sen jälkeen analysoitiin ohran (*Hordeum vulgare* L.) maaperän ominaisuuksien sekä kasvun ja ravinteiden saannin muutokset. Tutkimuksessa havaittiin, että frassi on yhtä tehokas parantamaan ohran biomassaa, sekä N, P ja K:n imeytymistä kuin NPK-lannoite. Mineraalilannoitteisiin verrattuna vesiliukoisen fosforin pitoisuus oli viisi kertaa pienempi, kun käytettiin frassia. Frassi estää P:n häviämisen ja sorption maaperän aineosiin. Frassin käyttö stimuloi maaperän mikrobiaktiivisuutta, varsinkin kun se

sekoitettiin mineraalilannoitteisiin. Tulokset osoittavat, että frassia voidaan käyttää NPK-mineraalilannoitteiden osittaisina tai täydellisinä korvikkeina.³⁹

Nopean mineralisoitumisen ja korkean, helposti saatavissa olevan ravinnepitoisuuden vuoksi frassilla on samanlainen tehokkuus käyttää N, P ja K ja ylläpitää biomassan tuotantoa kuin NPK-lannoitteella. Tärkeintä on, että frassin käyttö voi lisätä mikrobien metabolista aktiivisuutta ja monimuotoisuutta, mikä viittaa maaperän parempaan toimintaan varsinkin, kun frassia yhdistetään mineraalilannoitteeseen.³⁹

6 YHTEENVETO

Hyönteiset voivat syntetisoida kitiiniä glukoosista, glukosamiinista tai GlcNAc:sta. Hyönteisten kutikula koostuu pääosin kitiinin muodostamista ketjuista sekä kitiiniverkoston, typen ja proteiinien alustasta. Kutikulan kitiini on osittain deasetyloitunutta, joten se sisältää myös kitiinin hajoamistuotteita kitosaania ja kito-oligosakkarideja. Maailman toiseksi yleisin biomassa kitiini voi auttaa suomalaista maataloutta. Kitiinillä ja sen hajoamistuotteilla, kuten esimerkiksi kitosaanilla, voidaan aktivoida kasvien puolustusmekanismeja tuholaisia vastaan, lannoittaa tehokkaammin ja ympäristöystävällisemmin sekä parantaa hyödyllisen pieneliöstön toimintaa maaperässä.

Kitosaanilla on rooli geenien ilmentymisen säätelyssä ja molekyylien puolustusjärjestelmien indusoinnissa kasveissa ja sadonkorjuun jälkeisissä tuotteissa. Kasvit ovat kehittäneet geneettisiä ominaisuuksiaan siten, että kasvinsyöjähyönteisille altistuttuaan, kasvien transkriptionaaliset ominaisuudet reagoivat tilanteeseen. Kasvit pystyvät aloittamaan puolustuskykyiset reaktiot taudinaiheuttajia vastaan. Kasvit aistivat ympäristötekijöitä solun pinnan reseptoreilla. Erilaisten kasvin pinnalla olevien reseptorimolekyylien (reseptorikinaasit) avulla kasvit tunnistavat esimerkiksi kasvinsyöjähyönteiset. Erilaiset reseptorikinaasit tunnistavat tiettyjä kasvihormoneja ja muita kasvisolun tuottamia signaalimolekyyliä, sekä kasvia häiritseviä taudinaiheuttajia. Solukalvon läpäisevät reseptorikinaasit voivat tunnistaa muun muassa bakteerien siimojen peptidirakenteita ja sienirihmojen solunseinän kitiinin. Reseptorikinaasien on havaittu muodostavan solukalvoon oligomeerisiä komplekseja. Kompleksit koostuvat ligandin tunnistavasta reseptorikinaasista ja sitä avustavista reseptoreista. Ligandin sitoutuminen aktivoi reseptorikinaasien solunsisäisiä kinaasidomeeneja, jotka välittävät signaalin eteenpäin sytoplasmassa odotteleviin proteiinikinaaseihin. Erilaiset proteiinikinaasien muodostamat tiedonvälityskanavat sukkuloivat viestejä peräkkäisten proteiinifosforylaatioiden sarjoina ilmentyen kasvin kasvun ja stressivasteiden säätelyssä. Solun sisäisen signaaliverkon avulla viestit kulkeutuvat solun tumaan. Tämä saa aikaan geenitoiminnan muutoksia, jotka sopeuttavat aineenvaihdunnan reaktioita, kasvua ja puolustusvasteita ympäristössä vallitseviin olosuhteisiin. Nämä muutokset laukaistaan, kun kasvi tunnistaa useita signaaleja, jotka vapautuvat molempien sekä kasvien että patogeenien soluseinien keskinäisen entsymaattisen hajoamisen tuotteina. Oligosakkaridien joukossa

soluseinän pektiinien oligogalakturenoidit, β -glukaanit ja sienisoluseinän kitiini- ja kitosaanifragmentit ovat potentiaalisia induktoreita resistenssille ja suojalle kasvien erilaisilta patogeeneiltä ja tuhohyönteisiltä. Kitosaania voidaan käyttää kasvin immuunijärjestelmän biostimulanttina erilaisten kasvua haittaavien ympäristötekijöiden, kuten sienien, bakteerien ja sukkulamatojen torjumiseksi. Mikäli kasvien kasvatuksessa käytettäisiin hyönteisten kitiini-/kitosaanipitoista frassia, kasvi ehtisi valmistaa kasvituholaista varten tehoaineita jo ennen niiden saapumista.

Luonnossa kitiiniä ei esiinny puhtaana muotona, vaan kitiiniproteiineina, kitiinipigmentteinä tai kitiini-mineraaliyhdistelmämateriaaleina, mikä vaikeuttaa sen tunnistamista. Näin ollen erittäin herkkien analyttisten menetelmien kehittäminen sen tunnistamiseksi on ollut ratkaisevan tärkeää nykyaikaisen kitiiniin liittyvän tekniikan edistämiseksi. Kitiinin tunnistamiseen ei ole olemassa ihanteellista menetelmää. Analyttisen tiedon saamiseksi kitiinin läsnäolosta tulisi käyttää useita menetelmiä. Tärkeimmät parametrit kitiinien ja kitosaanien kemiallisten ja fysikaalisten ominaisuuksien määrittämisessä ovat asetylaatio- tai deasetylaatioaste sekä molekyylimassa ja sen jakautuminen. Molempiin parametreihin vaikuttavat lähtöaineen valmistusmenetelmä ja biologinen lähde. Nämä määräävät näiden polysakkaridien toiminallisia, fysikaaliskemiallisia ja biologisia ominaisuuksia, jotka ovat olennaisia halutun sovellutuksen tai lopputuotteen valinnassa.

Maatalouden näkökulmasta frassin N-, K- ja P-pitoisuudet ovat yhtä korkeat kuin lannan pitoisuudet. Tästä syystä hyönteisten frassi sopii lannoitteeksi yksistään. Kitiinin hajoamistuotetta kitosaania on jo käytetty rajoittamaan epäorgaanisten lannoitteiden haitallisia vaikutuksia. Käytettäessä frassia todettiin, että mineraalilannoitteisiin verrattuna vesiliukoisien fosforin pitoisuus oli viisi kertaa pienempi frassin läsnä ollessa, mikä estää fosforin menetyksen ja sorption maaperän ainesosiin. Nopean mineralisaation ja korkean, helposti saatavan ravinnepitoisuuden ansiosta, frassilla on samanlaiset mahdollisuudet vapauttaa N-, P- ja K-ravinteita ja ylläpitää biomassan tuotantoa kuin NPK-lannoitteella esimerkiksi ohran viljelyssä. Frassia voidaan käyttää NPK-mineraalilannoitteiden osittaisina tai täydellisinä korvikkeina.

Maatalouden ympäristövaikutusten minimoimiseksi on tärkeää vähentää lannoitteiden ja pestisidien käyttöä. Kitosaanipäällysteen käyttö lannoitteissa parantaa kasvilannoitteiden oton tehokkuutta ja vähentää myös tuotantokustannuksia. Kitosaanibiolannoite ja

kitosaanilla päällystetty lannoite laukaisevat kasvien kasvua enemmän kuin synteettiset lannoitteet. Lisäksi kitosaani stimuloi kasvien symbioottisten mikrobien aktiivisuutta, mikä johtaa muutokseen ritsosfäärin mikrobitasapainossa, mikä heikentää edelleen kasvipatogeeneja.

Hitaasti vapautuvissa lannoitteissa ravinnepitoisuudet vapautuvat vähitellen ja samaan aikaan kasvin ravintotarpeiden kanssa. Nämä lannoitteet voidaan valmistaa päällystämällä perinteisten NPK-lannoitteiden rakeet erilaisilla materiaaleilla, jotka vähentävät niiden liukenemisnopeutta. Kitosaani on lupaava päällystemateriaali. Hitaasti vapautuvien lannoitteiden ja superabsorboituneiden polymeerien P(AA-co-AM) optimoitu yhdistelmä parantaa kasvien ravinnepitoisuutta, lieventää vesiliukoisten lannoitteiden ympäristövaikutuksia ja vähentää veden haihtumista eli se alentaa kastelutiheyttä.

Kasvien puolustusmekanismien ymmärtäminen ja kitiinin ja sen hajoamistuotteiden potentiaalin ymmärtäminen tuhohyönteisten ja kasvitautilien vähentäjänä, sekä lannoitepotentiaalin tunteminen auttavat tutkijoita maataloussektorilla tuotteiden ja innovaatioiden kehittämisessä suomalaisiin olosuhteisiin. Suomessa saatavilla olevat kitiinipitoiset sivuvirrat näyttävät olevan potentiaalinen ja monipuolinen raaka-aine maataloudessa. Suomen maatalouteen voidaan kehittää parempia menetelmiä tuhohyönteisten ehkäisyyn ja lannoitteiden parempaan kontrollointiin viljelyssä sekä hyödyntämään hyönteisten frassin sivuvirtoja.

7 KIRJALLISUUSVIITTEET

1. Croisier, F., Jérôme, C., *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 780-792.
2. Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H., Hirano S., *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, *27*, 99-105.
3. Andersen, S., Biochemistry of Insect Cuticle. *Annu. Rev. Entomol.* **1979**, *24*, 29-6.
4. Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Peniche C., Higuera-Ciapara, I., *Dev. Food Sci.* **2000**, *41*, 265-308.
5. Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A. *Curr. Chem.* **2009**, *3*, 203–230.
6. Gardner, K.H., Blackwell, J., *Biopolymers.* **1975**, *14*, 1581–1595.
7. Minke, R., Blackwell, J., *J. Mol. Biol.* **1978**, *120*, 167–181.
8. Landman, N., Harries, P., *Chitin Formation and Diagenesis*. Springer, Mohali, India **2011**, 1-35.
9. Doucet, D., Retnakaran, A., *Adv. in Insect Physiol.* **2012**, *43*, 437-511.
10. Kramer, K.J., Koga, D., *Insect Biochemi.* **1986**, *16*, 851-877.
11. Beament, J.W.L., Treherne, J.E., Wigglesworth, V.B., *Adv. in Insect Physiol.* Department of Zoology, The University, Cambridge, England, **1963**, 437-511.
12. Jiang, T., James, R., Kumbar, S.G., Laurencin, C.T., *Natural and Synthetic Biomedic. Polym.* **2014**, 91-113.
13. Rabea, E.I., Badaway, M.E., Stevens, C.V., Smagghe, G., Staurbaut, W., *Biomacromol.* **2003**, *4*, 1457-1465.
14. Mourya, V.K., Inamdar, N.N., Choudhari, Y.M., *Polym. Sci. Ser.* **2011**, *53*, 583-612
15. Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F.M., teoksessa: *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, toimittajat Belgacem, M.N., Gandini, A., Elsevier, The Netherlands, **2008**, 517-542.
16. Yuan, Y., Chesnutt, B.M., Haggard, W.O., Bumgardner, J.D. *Materials.* **2011**, *4*, 1399-1416.
17. Khor, E., Lim, L.Y. *Biomat.* **2003**, *24*, 2339-2349.
18. Anitha, A., Sowmya, S., Sudheesh Kumar, P.T., Deepthi, S., Chennazhi, K.P., Ehrlich, H., Tsurkan, M., Jayakumar, R., *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 1644-1667.
19. Fujimoto, T., Tsuchiya, Y., Terao, M., Nakamura, K., Yamamoto, M., *Int. J. Food Microb.* **2006**, *112*, 96-101.
20. Naveed, M., Phil, L., Sohail, M., Hasnat, M., Muhammad, M., Baig, F.A., Ihsan, A.U., Shumzaid, M., Kakar, M.U., Khan, T.M., Akabar, M.D., Hussain, M.I., Zhou, Q.G., *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *129*, 827-843.
21. Jung, W.J., Park, R.D., *Mar. Drugs.* **2014**, *12*, 5328-5356.
22. Mourya, V.K., Inamdar, N.N., Choudhari, Y.M., *Polym. Sci.* **2011**, *53*, 583–612.
23. Li, K., Xing, R., Liu, S., Qin, Y., Li, B., Wang, X., Li, P., *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 826-830.
24. Joao, F., Frenik, T., Joséc, S., Oscars, R., Mjoao, M., Manuelae, P., Fxavier, M., *Food Microbiol.* **2008**, *25*, 922–928.
25. Harish Prashanth, K.V. Tharanathan, R.N., *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1722*, 22-29.
26. Park, J.K., Mi, J.C., Choi, H.N., Yong, I.P., *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 266-277.

27. Santosmoriano, P., Fernandezarrojo, L., Mengibar, M., Belmonterech, E., Peñalver, P., Acosta, F.N., Ballesteros, A.O., Morales, J.C., Kidibule, P., Fernandezlobato, M., *Biocatal. Biotransformation*. **2018**, *35*, 57-67.
28. Liang, T.W., Chen, W.T., Lin, Z.H., Kuo, K.H., Nguyen, A.D., Pan, P.S., Wang, S.L., *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1302.
29. Dang, Y., Li, S., Wang, W., Wang, S., Zou, M., Guo, Y., Fan, J., Du, Y., Zhang, J., *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1075–1081.
30. Kim, H.M., Hong, S.H., Yoo, S.J., Baek, K.S., Jeon, Y.J., Choung, S.Y., *J. Med. Food*. **2006**, *9*, 427–430.
31. Xing, R., Liu, Y., Li, K., Yu, H., Liu, S., Yang, Y., Chen, X., Li, P., *Carbohydr. Polym.* **2016**, *157*, 1288-1297.
32. Liaqat, F., Eltem, R., *Carbohydr. Polym.* **2018**, *184*, 243-259.
33. Gonil, P., Sajomsang, W., *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 514-522.
34. No, H.K., Samuel, P., *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **1995**, *4*, 27-52.
35. Kramer, K.J, Hopkins, T.L, Schaefer, J., *Mol. Biol.* **1995**, *25*, 1067-1080.
36. Finke, M.D., *Zoo Biol.* **2007**, *26*, 105-115.
37. Gullan ,P.J., Cranston, P. S., Binnington, K., Retnakara, A., *The Insects: An Outline of Entomology*.3, Blackwell Publishing Ltd. 350 Main Street, Malden, USA, **2005**. 22-84.
38. Moussian, B., *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *40*, 363-375.
39. Houben, D, Daoulas, G., Faucon, M-P., Dulaurent, A-M., *Scientific Rep.* **2020**, *10*, 4659.
40. Brzezinska, MS., Jankiewicz, U., *Current Microbiol.* **2014**, *68*, 1 - 81.
41. Shalaby, E.A., *Chitosan from Marine Crustaceans: Production, Characterization and Applications*. 1, Dajana Pemac, Croatia, **2016**. 39-56.
42. Chen, P.Y., Lin A.Y.M., McKittrick, J., Meyers, M.A., *Acta Biomater.* **2007**. 587-96.
43. Raabe, D., Sachs, C., Romano, P. *Acta Mater.* **2005**, *53*, 4281-4292.
44. Hahn, T., Tafi, E., Paul, A., Salvia, R., Falabella, P., Zibek, S., *J. Chem. Tech. and Biotech.* **2020**, *95*, 2775-2795.
45. Mohammed, M.H, Williams, P.A., Tverezovskaya, O., *Food Hydrocoll.* **2013**, *31*, 166-171.
46. Tsurkan, M.V., Voronkina, A., Khrunyk, Y., Wysokowski, M., Petrenko, I., Ehrlich, H., *Carbohydr. Polym.* **2021**, *252*, 117-204.
47. Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczynski, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thoming, J., *Mar. Drugs*. **2010**, *8*, 1567-1636.
48. Abdou, E.S., Nagy, K.S.A., Elsabee, M.Z., *Bioresource Tech.* **2008**, *99*, 1359-1367
49. Cárdenas, G., Cabrera, G., Taboada, E., Miranda, S.P., *J. Appl. Pol.* **2004**, *93*, 1876-1885.
50. Kezuka, Y., Kojima, M., Mizuno, R., Suzuki, K., Watanabe, T., Nonaka, T., *Proteins*. **2010**, *78*, 2295-2305.
51. Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P., *Prog. in Polym. Sci.* **2009**, *34*, 641-678.
52. Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S-I., Shimoda, K., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1993**, *31*, 485–491.
53. Paulino, A.T., Simionato, I. J., Garcia, J.C., Nozaki, J., *Carbohydr. Pol.* **2006**, *64*, 98-103.
54. Kaya, M., Sargin, I., Aylanc, V., Nebi, M., Seda, T., Isil, G., Nazlican, K., Yasar, C., Sak, G., Bulut, E., *J. Ind. Eng. Chem. Res.* **2016**, *38*, 146-156.

55. Soon, C.Y., Tee, Y.B., Tan, C.H., Rosnita, A.T., Khalina, A., *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 108, 135–142.
56. AlSagheer, F.A., Al-Sughayer, M.A., Muslim, S., Elsabee, M.Z., *Carbohydr. Pol.* **2009**, 77, 410-419.
57. Atkins, E.D.T., Dlugosz, J., Foord, S., *Int. J. Biol. Macromol.* **1979**, 1, 29-32.
58. Umeyama, T., Baek, J., Sato, Y., Suenaga, K., Abou-Chahine, F., Tkachenko, N.V., Lemmetyinen, H., Imahori, H., *Nature Communicat.* **2015**, 6, 7732.
59. Crespo, M.O.P., Martínez, V.M., Hernández, J.L., Yusty, M.A.L., *J. Chrom.* **2006**, 1116, 189-192.
60. Vårum, K.M., Antohonsen, M.V., Grasdalen, H., Smidsrød, O., *Carbohydr. Res.* **1991**, 211, 17-23.
61. Vårum, K.M., Antohonsen, M.V., Grasdalen, H., Smidsrød, O., *Carbohydr. Res.* **1991**, 217, 19-27.
62. Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrières, J., Versali, M-F., Rinaudo, M., *Biomacromol.* **2000**, 4, 746–751.
63. Sajomsang, W., Gonil, P., *Mater. Sci. Eng. C.* **2010**, 30, 357-363
64. Baldwin, I.T., Halitschke, R., Kessler, A., Schittko, U., *Cur. Op. Plant Biol.* **2001**, 4, 351-358.
65. Dicke, M., Agrawal, A., Bruin, J., *Res. Foc.* **2003**, 8, 403-405.
66. Punkkinen, M., SNF1-related protein kinases: activation, responses to osmotic stress, and cuticle formation. Väitöskirja, Turun yliopisto. **2019**.
67. Rahikainen, M., Kangasjärvi, S., *Luonnon tutkija.* **2013**, 4, 145-147.
68. Kangasjärvi, S., Neukermans, J., Li, S., Aro, E.M., Noctor, G., *J. Exp. Bot.* **2012**, 63, 1619-1636.
69. Holopainen, J.K., Gershenzon, J., *Trend in Plant Sci.* **2010**, 15, 176-184.
70. Brunner, F., Stintzi, A., Fritig, B., Legrand, M., *The Plant J.* **1998**, 14, 225-234.
71. Libantova, J., Kämäräinen, T., Moravcikova, J., Matusikova, I., Salaj, J., *Mol. Biol. Rep.* **2009**, 36, 851-856.
72. OvtSYna, A., Schultze, M., Tichonovich, I., Spaink, H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Staehelin, C., *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2000**, 13, 799-807.
73. Suarez, V., Staehelin, C., Arango, R., Holtorf, H., Hofsteenge, J., Meins, F., *Plant Mol. Biol.* **2001**, 45, 609-618.
74. Hengel, A. van, Chitinases and arabinogalactan proteins in somatic embryogenesis. Väitöskirja. The Agricultural University of Wageningen. **1998**.
75. Domon, J., Neutelings, G., Roger, D., David, L., David, H., *J. Plant Physiology.* **2000**, 156, 33-39.
76. Sanchez-Rodriguez, C., Bauer, S., Hematy, K., Saxe, F., Belen Ibanez, A., Vodermaier, V., Konlechner, C., Sampathkumar, A., Rüggeberg, M., Aichinger, E., Neumetzler, R., Burgert, I., Somerville, C., Hauser, M.-T., Persson, S., *Plant Cell.* **2012**, 24, 589-607.
77. Langner, T., Göhre, V., *Current Genetics.* **2016**, 62, 243-254.
78. Sathiyabama, M., Akila, G., Charles, R.E., *Arch. Phytop. Pl. Prot.* **2014**, 47, 1963-1973.
79. Jail, N.G.D., Luiz, C., Neto, R., Di Piero, R.M., *Trop. Plant Pathol.* **2014**, 39, 434-441.
80. Reddy, M.B., Angers, P., Castaigne, F., Arul, J., *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2000**, 125, 742-747.

81. Escudero, N., Lopez-Moya, F., Ghahremani, Z., Zavala-Gonzalez, E.A., Alaguero-Cordovilla, A., Ros-Ibañez, C., Lacasa, A., Sorribas, F.J., Lopez-Llorca, L.V., *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1415.
82. Malinovsky, F.G., Fangel, J.U., Willats, W.G.T., *Front Plant Sci.* **2014**; *5*, 178.
83. Tsai, G.J., Su, W.H., *J. Food. Prot.* **1999**, *62*, 239-243.
84. Faoro, F., *IOBC-WPRS Bulletin.* **2013**, *89*, 199-203.
85. Chirkov, S., Il'ina, A., Surgucheva, N., Letunova, E., Varitsev, Y.A., Tatarinova, N.Y., Varlamov, V., Russ, J., *Plant Physiol.* **2001**, *48*, 774-779.
86. Bondok, A., *Am.-Eur. J. Agric. Environ. Sci.* **2015**, *15*, 1520-1529.
87. Hadwiger, L., Kendra, D., Fristensky, B., Wagoner, W., *In Chitin in Nature and Technology*, Springer, Belin, Germany, **1986**, 209-214.
88. Limpanavech, P., Chaiyasuta, S., Vongprommek, R., Pichyangkura, R., Khunwasi, C., Chadchawan, S., Lotrakul, P., Bunjongrat, R., Chaidee, A., Bangyeekhun, T., *Sci. Hortic.* **2008**, *116*, 65-72.
89. Hadwiger, L.A., *Plant Sci.* **2013**, *208*, 42-49.
90. Van Loon, L., Van Strien, E., *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1999**, *55*, 85-97.
91. Ramkissoo, A., Francis, J., Bowrin, V., Ramjegathesh, R., Ramsubhag, A., Jayaraman, J., *Ann. Appl. Biol.* **2016**, *169*, 274-283.
92. Boon-Ek, Y., Jitareerat, P., Wongs-Aree, C., Buanong, M., Obsuwan, K., *Southeast Asia Symp. Qual. Manag. Post-harvest Syst.* **2013**, 1088, 461-464.
93. Landi, L., Feliziani, E., Romanazzi, G., *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3047-3056.
94. Wang, S.Y., Gao, H., *LWT-Food Sci. Technol.* **2013**, *52*, 71-79.
95. Zhang, D., Quantick, P.C., *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **1998**, *73*, 763-767.
96. Feliziani, E., Smilanick, J., Margosan, D., Mansour, M., Romanazzi, G., Gu, S., Gohil, H., Ames, Z.R., *Plant Dis.* **2013**, *97*, 307-314.
97. Fagan, W.F., Siemann, E., Mitter, C., Denno, R.F., Huberty, A.F., Woods, A., Elser, J.J., *Am. Nat.* **2002**, *160*, 784-802.
98. Hollinger, D.Y., *Oecologia.* **1986**, *70*, 291-297.
99. Antonie, B.J., *Hydrobiol.* **1981**, *83*, 343-350.
100. Plummer, G.L., Kethley, J.B., *Bot. Gaz.* **1964**, *125*, 245-260.
101. Xia, W., Liu, P., Liu, J., *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 6751-6762.
102. Skujin š, J., Pukite A., McLaren A.D., *Mol. Cell. Biochem.* **1973**, *2*, 221-228.
103. Ekborg, N.A., Morrill, W., Burgoyne, A.M., Li L., Distel D.L., *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 7785-7788.
104. Souza, C.P., Almeida, B.C., Colwell, R.R., Rivera I.N., *Mar. Biotechnol.* **2011**, *13*, 823-830.
105. Fuchs, R. L., McPherson, S. A., Drahos, D. J., *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *51*, 504-509.
106. Romaguera, A., Menge, U., Breves, R., Diekmann, H., *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 3450-3454.
107. Saito, A., Fujii, T., Yoneyama, T., Redenbach, M., Ohno, T., Watanabe, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 710-718.
108. Shimosaka, M., Fukumori, Y., Narita, T., Zhang, X.Y., Kodaira, R., Nogawa, M., *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91*, 103-105.
109. Tsujibo, H., Kubota, T., Yamamoto, M., Miyamoto, K., Inamori, Y., *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 894-900.
110. Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Nikaidou, N., Watanabe, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 128-135.

111. Gal, S.W., Choi, J.Y., Kim, C.Y., Cheong, Y.H., Choi, Y.J., Lee, S.Y., *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *160*, 151-158.
112. Suzuki, K., Taiyoji, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B., Watanabe, T., *Biochem. J.* **1999**, *343*, 587-596.
113. Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 1075-1083.
114. Horn, S.J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørli, M., Vårum, K. *FEBS J.* **2006**, *273*, 491-503.
115. Sikorski, P., Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijssink, V.G.H., Vårum, K.M., *Biochem.* **2006**, *45*, 9566-9574.
116. Scigelova, M., Crout, D.H.G. (1999). *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 3-14.
117. Swiontek, M., Jankiewicz, B.U., Walczaka, M., *Int. Biodeter. Biodegr.* **2013**, *84*, 104-110.
118. Escudero, N., Lopez-Moya, F., Ghahremani, Z., Zavala-Gonzalez, E.A., Alaguero-Cordovilla, A., Ros-Ibañez, C., Lacasa, A., Sorribas, F.J., Lopez-Llorca, L.V., *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1415.
119. Jail, N.G.D., Luiz, C., Neto, R., Di Piero, R.M., *Trop. Plant Pathol.* **2014**, *39*, 434-441.
120. O'Herlihy, E.A., Duffy, E.M., Cassells, A.C., *Folia Geobot.* **2003**, *38*, 201-207.
121. Ohta, K., Atarashi, H., Shimatani, Y., Matsumoto, S., Asao, T., Hosoki, T., *J. Japan Soc. Hort. Sci.* **2000**, *69*, 63-65.
122. Chen, Y., Yuan, S., Liu, H-M., Chen, Z-Y., Zhang, Y-H., Zhang, H-Y., *Horticult. Envir. Biotech.* **2016**, *57*, 1-10.
123. Silva, W.O., Stamford, M.P., Silva, E.V.M., Santos, C.E.R.S, Freitas, A.D.S., Silva, M.V., *Sci. Horticult.* **2016**, *209*, 236-240.
124. Salachna, P., Grzeszczuk, M., Soból, M., *Growth. Molecules.* 2017, *22*, 1903.
125. Trenkel, M.E., *Controlled-Release and Stabilized Fertilizers in Agriculture; International Fertilizer Industry Association, Paris, France, 1997.*
126. Savci, S., *Apchbee Procedia* **2012**, *1*, 287-292.
127. Tamme, T., Reinik, M., Roasto, M., Juhkam, K., Tenno, T., Kiis, A., *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 355-361.
128. Zebarth, B., Drury, C., Tremblay, N., Cambouris, A., *J. Soil Sci.* **2009**, *89*, 113-132.
129. Corradini, E., De Moura, M., Mattoso, L., *Express Polym. Lett.* **2010**, *4*, 509-515.
130. Hussain, M.R., Devi, R.R., Maji, T.K., *Iranian Polym. J.* **2012**, *21*, 473-479.
131. Wu, L., Liu, M., *Carbohydr. Pol.* **2008**, *72*, 240-247.

